

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**DOTTORATO DI RICERCA IN  
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE**

**XXIII CICLO**

**Coordinatore: Prof. Gianni Marone**

**TESI DI DOTTORATO**

***Aspetti molecolari associati al fenotipo psoriasico:  
possibili implicazioni patogenetiche***

**TUTOR**

**Chiar.mo Prof. Fabio Ayala**

**CANDIDATA**

**Dott. Filomena Flora**

## INDICE

• INTRODUZIONE.....	3
• <u>I LINEA SPERIMENTALE</u> .....	25
<i>DEAMIDAZIONE DELLE ASPARAGINE IN PROTEINE DELLA MEMBRANA ERITROCITARIA DI PAZIENTI AFFETTI DA PSORIASI A PLACCHE</i>	
• <u>II LINEA SPERIMENTALE</u> .....	45
<i>DEREGOLAZIONE DEL PROCESSO APOPTOTICO NELLA PSORIASI: RUOLO DI BCL-XL</i>	
• <u>III LINEA SPERIMENTALE</u> .....	62
<i>EFFETTO DELLA TERAPIA BIOLOGICA SUI LIVELLI PLASMATICI DI MCP1 IN PAZIENTI CON PSORIASI A PLACCHE</i>	
• SCOPO DELLA RICERCA.....	78
• MATERIALI E METODI.....	82
• RISULTATI E DISCUSSIONE.....	96
• CONCLUSIONI.....	129
• BIBLIOGRAFIA.....	139

# INTRODUZIONE

## LA PSORIASI

*“La psoriasi è una dermatite eritemato-squamosa a decorso cronico, su base genetica, con patogenesi complessa, prevalenza immunitaria, caratterizzata da eruzioni eritemato-desquamanti a margini netti e di varia dimensione. Prevede fasi di miglioramento, di remissione spontanea e di esacerbazione. È spesso associata ad artropatia”.*

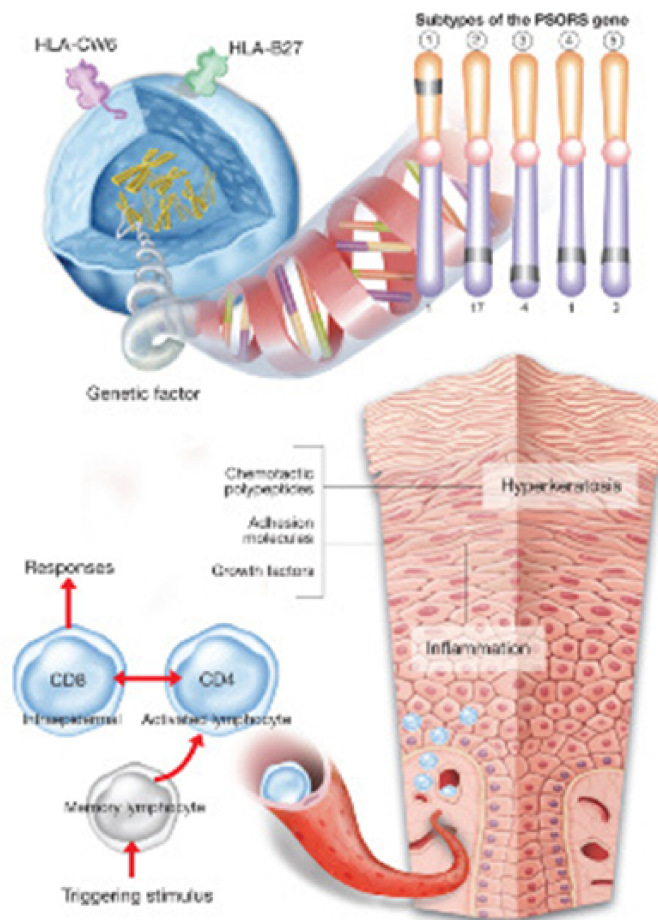
## ASPETTI GENERALI

La parola psoriasi prende origine dal Greco “ψώρα”- psora, coniata da Ippocrate di Cos (V° sec. a.C) e la prima chiara descrizione clinica è attribuita al dermatologo anglosassone Robert Willan che nel 1808 pubblicò l’opera “*On cutaneous disease*”.

La psoriasi (OMIM %177900) colpisce circa il 2,5% della popolazione mondiale (Christopher *et al.*, 2001); la frequenza è piuttosto alta nei paesi industrializzati, mentre è notevolmente inferiore nei paesi in via di sviluppo. In Italia le persone affette da questa malattia sono circa 1.000.000.

La psoriasi è una malattia multigenica e multifattoriale, caratterizzata da infiammazione della cute, iperproliferazione dei cheratinociti e infiltrazione linfocitaria a livello del derma (Loews *et al.*, 2007) (Fig.1).

## PREDISPOSIZIONE GENETICA E PSORIASI



**Figura 1.** La figura mostra le caratteristiche principali della psoriasi: la predisposizione genetica e le alterazioni a carico del tessuto epiteliale e del sistema immunitario.



Questi eventi provocano la comparsa di placche eritematose, papule e lesioni, variamente distribuite lungo la superficie corporea (Fig. 2).



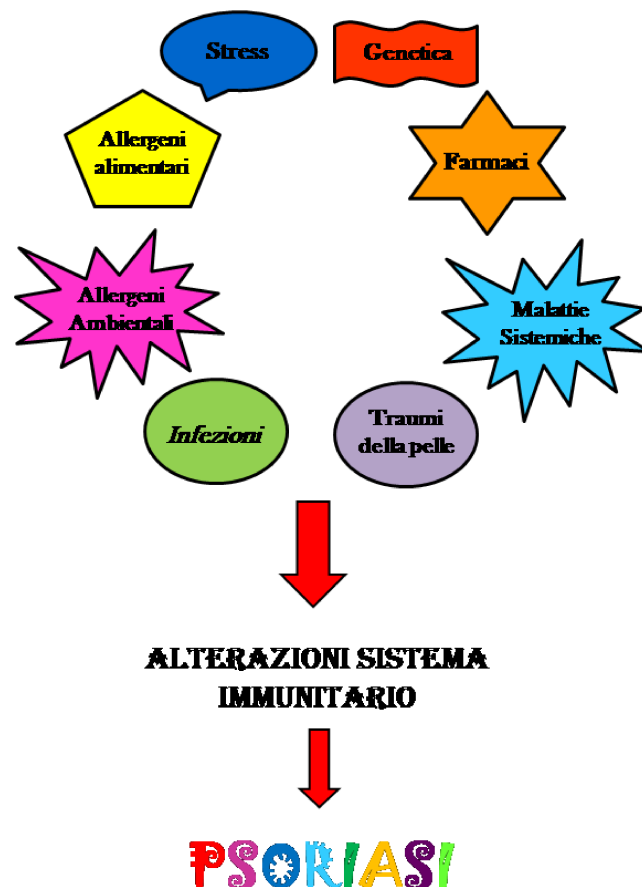
**Figura 2.** Placca eritemato-squamosa con le tipiche squame bianco argenteo, caratteristica della psoriasi.

Le lesioni compaiono di preferenza a livello della cute di zone convesse, in particolare gomiti, ginocchia, mani, piedi, spalle e cuoio capelluto, sebbene nei casi più severi è possibile avere lesioni anche in zone concave, quali ascelle, inguine, regione sottomammellare ed ombelico. A livello della placca, la cute, oltre a risultare dolente ed arrossata, appare ispessita e, nell'arco di qualche mese, va incontro ad un processo di sfaldamento che induce la formazione delle caratteristiche scaglie argentate tipiche della malattia (Traub *et al.*, 2007).

L'esordio della psoriasi può essere improvviso o graduale. I segni e i sintomi caratteristici comprendono: secchezza della cute, arrossamento, occasionale prurito, pelle striata o a chiazze, dolore articolare e sensazione di bruciore, specie se la placca si localizza in zone sensibili come occhio o inguine. La psoriasi può insorgere a qualsiasi età (con una media intorno ai 28 anni) e in entrambi i sessi, sebbene esista una leggera prevalenza nel sesso femminile, soprattutto per quanto riguarda le forme più severe. Un'altra caratteristica tipica, ma non esclusiva della psoriasi, è il ***fenomeno di Koebner*** (o ***isomorfismo reattivo***), che

consiste nella comparsa di chiazze psoriasiche in sedi soggette a stress meccanici (scarificazione, ustione, cicatrici chirurgiche).

Classificare la psoriasi come una malattia dermatologica si è rivelato, nel tempo, piuttosto riduttivo: la psoriasi è, infatti, spesso associata a disturbi di carattere sistemico, tra cui disordini metabolici, quali dislipidemia, obesità e diabete. Non va, inoltre, sottovalutato l'enorme impatto che la patologia ha sullo stato emozionale del paziente; a supporto di questa osservazione esiste l'evidenza di una associazione tra la psoriasi e uno stato depressivo del paziente, stato che spesso ha l'effetto di aggravare ulteriormente i sintomi della patologia (Naldi *et al.*, 2007) (Fig. 3).



**Figura 3.** La figura schematizza le possibili cause dell'insorgenza della patologia psoriasica.

## ***LE BASI GENETICHE***

La psoriasi è una patologia di tipo complesso, caratterizzata dall'interazione tra più geni predisponenti (o *loci di suscettibilità*) e fattori ambientali che, insieme, determinano la predisposizione individuale o familiare a sviluppare le varie forme della patologia. La psoriasi è una malattia con una evidente componente di familiarità, dal momento che spesso insorge in individui diversi della stessa famiglia. Le analisi *genome-wide* degli ultimi anni hanno rivelato che non esiste un solo *locus* potenzialmente responsabile dell'insorgenza della psoriasi: numerose regioni, distribuite sui cromosomi più diversi, sembrano essere associate ad una maggiore suscettibilità a questa malattia (Capon *et al.*, 2002). I loci di suscettibilità della psoriasi corrispondono a regioni in cui localizzano geni coinvolti nei processi infiammatori o geni coinvolti nelle fasi di differenziamento delle proteine che compongono l'epidermide. L'identificazione dei geni di suscettibilità della psoriasi ha presentato diverse difficoltà, sia per la variabilità clinica della malattia, sia per l'eterogeneità genetica dovuta al grande numero di geni e proteine coinvolte nella patogenesi dell'infiammazione. Sono stati sinora identificati 8 loci genici di suscettibilità alla psoriasi (Bowcock AM.; 2003), localizzati in posizioni 6q21 (***PSORS1***), 17qter (***PSORS2***), 4q34 (***PSORS3***), 1q21 (***PSORS4***), 3q21 (***PSORS5***), 19p13 (***PSORS6***), 1p32 (***PSORS7***) e 4q31-34 (***PSORS9***); loci di suscettibilità addizionali sono stati suggeriti anche per altri cromosomi (16q e 20p) (Capon *et al.*, 2001; Borgia *et al.*, 2002 ; Bowcock *et al.*, 2005).

Nella psoriasi esiste una forte associazione con il locus **HLA** (Human Leucocyte Antigene), nota da oltre 30 anni (Suarez-Almazor ME *et al.*, 1990), denominato ***PSORS1***. Questo locus è localizzato sul cromosoma 6p21.3, in una regione comprendente il complesso maggiore di istocompatibilità (**MHC**), in cui sono localizzati i geni per gli HLA. Questa regione è considerata il maggior locus di suscettibilità alla psoriasi ed è responsabile del 30-50% dei casi della malattia (Trembath *et al.*, 1997). L'HLA-C è coinvolto nella presentazione

dell'antigene verso le cellule CD8<sup>+</sup> e Natural Killer-T (NK-T). Sempre sul braccio corto del cromosoma 6 esistono altri geni correlati alla malattia: *HCR* e *CDSN* (Corneodesmosina). Il polimorfismo di *HCR* è associato ed aumentato nella psoriasi volgare, mentre *CDSN* codifica per la corneodesmosina, una proteina di adesione espressa dai cheratinociti ed iperepressa nella psoriasi (Matsumoto M. *et al.*, 2008). Il locus ***PSORS4*** si è rivelato di fondamentale importanza nella predisposizione genetica non solo alla psoriasi, ma anche a patologie dermatologiche diverse, in quanto risiede nella regione genica coinvolta nel differenziamento dell'epidermide (Helgi *et al.*, 2007), nota anche come ***EDC Complex*** (*Epidermal Differentiation Center*, Centro di Differenziamento dell'Epidermide). Tra i geni localizzati nell'EDC ricordiamo il gene *flc*, che codifica per la filaggrina, una proteina implicata nel legame dei filamenti di cheratina in macrofibrille, ed il gene *lor*, che codifica per la loricrina, una proteina strutturale dello strato corneo (Capon *et al.*, 1999). Queste due proteine sembrano svolgere un ruolo rilevante nella suscettibilità alle dermatosi di tipo psoriasico. All'interno del locus di suscettibilità ***PSORS2*** si trova invece il gene *socs3* (*Suppressor of Cytokine Signaling 3*). L'espressione di questo gene è indotta da diverse citochine, tra cui l'Interleuchina-6 (IL-6), l'Interleuchina-10 (IL-10) e l'IFN- $\gamma$  (Capon *et al.*, 2000). I geni sopramenzionati sono definiti geni di suscettibilità e sono responsabili del rischio di ereditare la malattia; oltre a questi geni, ne esistono altri, i cosiddetti geni modificati come ad esempio Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleuchina-10 (IL-10), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), responsabili, probabilmente, della severità e della diversità delle manifestazioni cliniche della psoriasi.

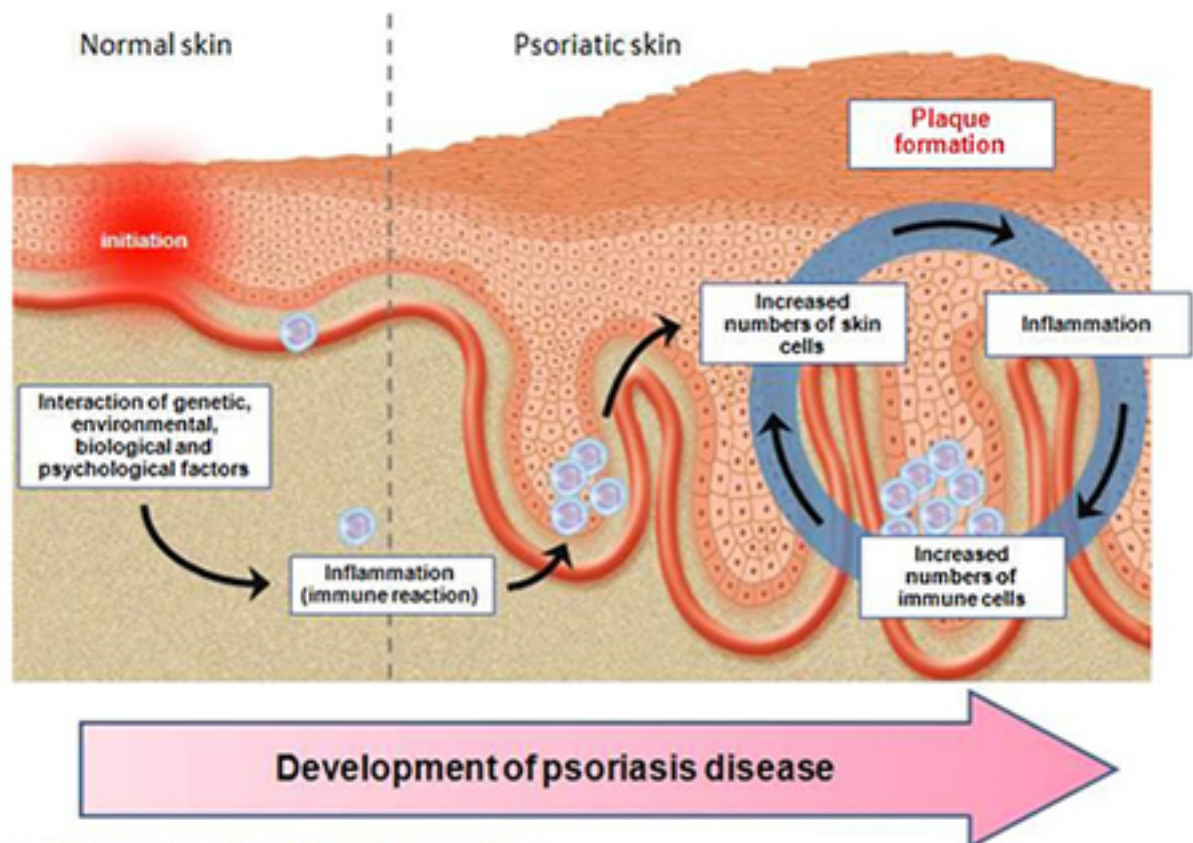
Recentemente un nuovo gene, ***KIR2DS1***, è stato associato. Si tratta del gene che attiva il recettore delle cellule NK. Tale recettore sarebbe costituito da immunoglobuline e sarebbe responsabile del riconoscimento delle molecole HLA-C da parte delle cellule natural killer (NK). Una iperespressione di tale gene sembra essere associata alla psoriasi, mentre un gene

della stessa famiglia, ma con attività inibente, avrebbe un'azione protettiva (Płoski R. *et al.*, 2006). Quanto detto finora dimostra che, geni di suscettibilità alla psoriasi esistono e che la loro localizzazione nel genoma è estremamente variabile; da queste osservazioni deriva una domanda a cui tutt'oggi non c'è una risposta definitiva: come possono geni diversi, situati in posizioni diverse del genoma, produrre un fenotipo con caratteristiche identiche indipendentemente dal gene stesso? Una possibile spiegazione è stata recentemente proposta da Guilhou *e coll.*, secondo cui la psoriasi potrebbe essere indotta, piuttosto che da geni specifici, dall'attivazione anomala di copie di una sequenza retrovirale ripetuta, localizzata in posizioni diverse nelle diverse popolazioni studiate (Guilhou *et al.*, 2008).

## **EZIOPATOGENESI**

Il tratto distintivo fondamentale della malattia psoriasica è una incontrollata proliferazione dei cheratinociti, associata ad una significativa alterazione del processo di differenziamento di queste cellule. In aggiunta, linfociti provenienti dal circolo ematico si infiltrano a livello del derma e dell'epidermide, instaurando una condizione infiammatoria a livello della lesione cutanea (fig.4).

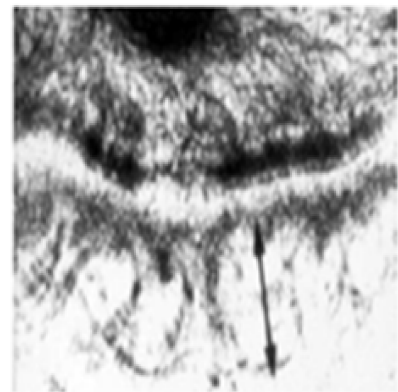
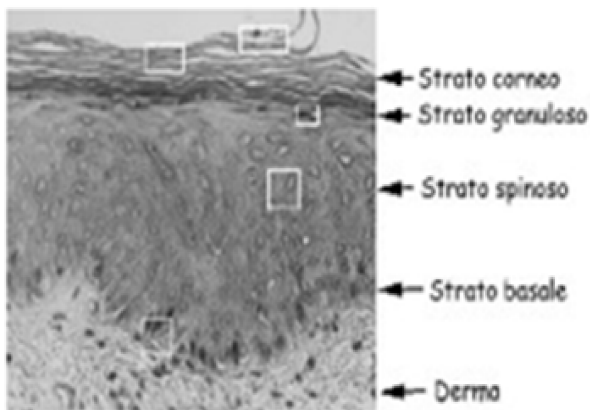
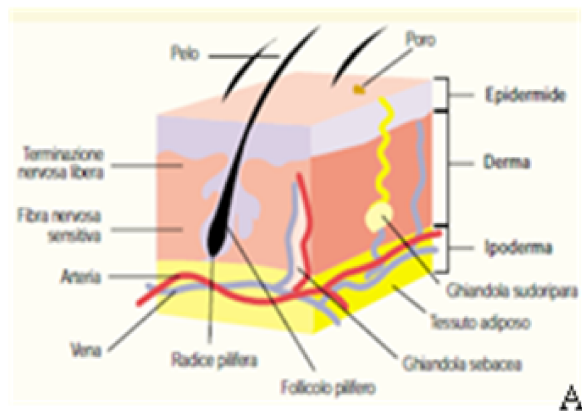
Per poter meglio comprendere l'insorgere della malattia, occorre conoscere la struttura e le funzioni della pelle.



**Figura 4.** La figura mostra, in maniera schematica, le caratteristiche della patologia psoriasica: iperproliferazione dei cheratinociti e infiammazione.

## **LA PELLE**

La cute è un organo che ha la funzione di rivestire il corpo umano, costituire una barriera che protegge dagli insulti meccanici e regolare i rapporti tra l'interno e l'esterno dell'organismo. La cute svolge, inoltre, un ruolo importante nella risposta immune ed ha proprietà metaboliche, essendo la sede della sintesi di vitamina D. Si tratta di una struttura complessa in cui ogni strato ha una funzione specifica. Partendo dalla superficie ed arrivando in profondità la cute è costituita da un epitelio, l'**epidermide**; da un tessuto connettivo, il **derma** e da un tessuto adiposo chiamato sottocutaneo o **ipoderma** (Fig. 5).



**Figura5. A) Visione tridimensionale della cute. B) Struttura anatomica dell'epidermide.** In questa immagine (microscopia ottica 250X) sono ben evidenti i differenti strati che costituiscono l'epidermide. Dal basso verso l'alto: il derma, lo strato basale (o germinativo), lo strato spinoso, lo strato granuloso e lo strato corneo. **C)** la freccia indica la membrana basale, interposta tra epidermide e derma.

L'**epidermide** è un epitelio polistratificato ad elementi labili. La cellula costituente questo tessuto è il **cheratinocita**, che presenta differenziazioni strutturali ed evolutive particolari, tali da determinare una suddivisione strutturale ed una funzionale del tessuto. Strutturalmente può essere suddiviso in cinque strati: *basale*, *spinoso*, *granuloso*, *lucido*, *corneo*. Dal punto di vista funzionale può essere diviso in *germinativo* e *differenziativo*.

Riguardo alla suddivisione funzionale si deve affermare che, fisiologicamente, il cheratinocita migra da una sede basale e germinativa epidermica verso la superficie, passando per le varie fasi differenziative, subendo un processo di maturazione definito cheratinizzazione, fino ad essere eliminato. Nello strato più superficiale, infatti, quello corneo, le cellule, ormai morte e anucleate, sono eliminate. Esiste un equilibrio tra le cellule prodotte dallo strato germinativo e le cellule eliminate da quello corneo, in modo tale da mantenere una omeostasi fisiologica.

Nello *strato basale*, lo strato più profondo e in contatto con il derma, esistono due sottopopolazioni di cheratinociti. Una che ha il compito di ancorare l'epidermide al derma, l'altra che ha lo scopo di produrre altre cellule figlie. La divisione per mitosi di una cellula dello strato basale dà origine a due cellule figlie, che possono mantenere la capacità proliferativa oppure risalire verso la superficie e differenziarsi gradualmente in cheratinociti.

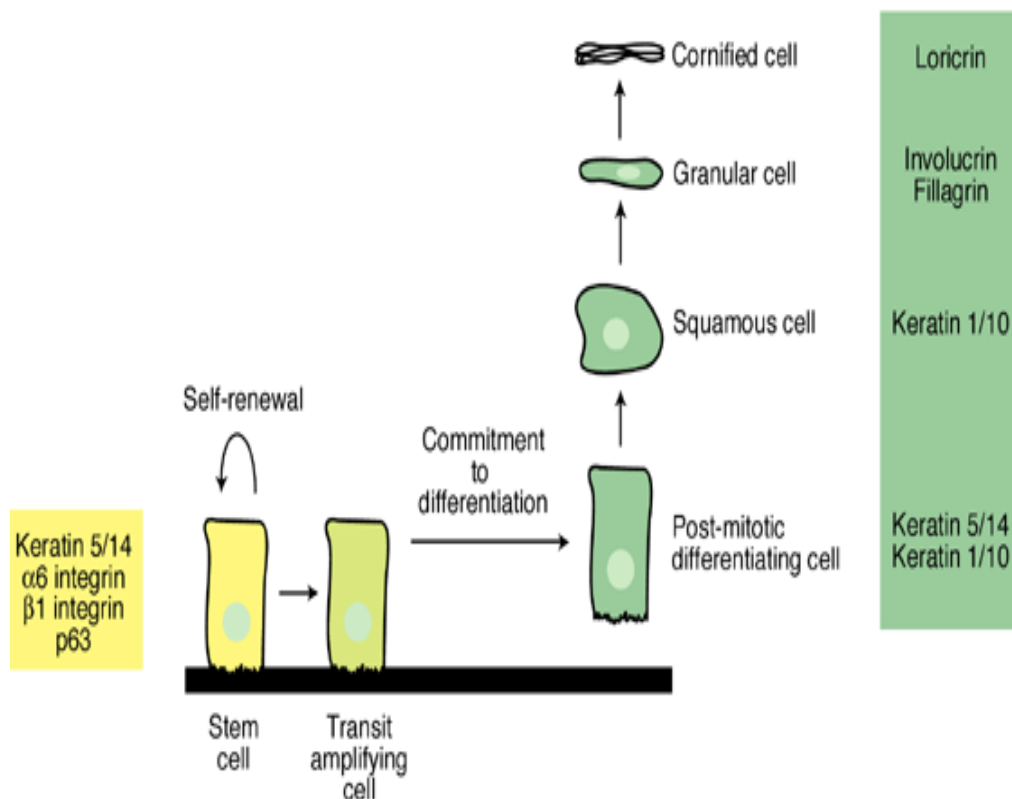
Il passaggio da cheratinociti staminali a cheratinociti differenziati passa attraverso una seconda popolazione di cellule, che si trovano in uno stadio maturativo intermedio, le *Transit Amplifying Cells* (TAC). Questo strato corrisponde con lo *strato germinativo*.

Successivamente le cellule migrano verso la superficie, costituendo lo *strato spinoso* o *Malpighiano*. Le cellule in questa fase della loro maturazione assumono una caratteristica specifica: risultano legate tra loro mediante dei processi spinosi, detti desmosomi, che hanno il compito di effettuare gli scambi metabolici e lo spostamento verso la superficie. Nella fase successiva le cellule appaiono ripiene di granuli, per questo il nuovo strato è chiamato *granuloso*. Il citoplasma è farcito di una sostanza solida, granulare, la cheratoialina. Nello



*strato lucido* le cellule mostrano un nucleo atrofico e sono piene di grosse gocce dense di eleidina. Le fibre cheratiniche sono quasi del tutto compatte. Il processo si completa, quindi, nello strato più esterno, quello *corneo*. Le cellule sono appiattite, enucleate, con spessa membrana cheratinica. La cheratina conferisce alle cellule cornee una spiccata resistenza agli enzimi proteolitici, agli acidi e agli alcali. Lo strato è poi sottoposto a sfaldamento, all'eliminazione delle cellule più vecchie. Le cellule che si trovano a subire questo processo hanno la funzione di rinnovare l'epidermide.

Nella cute sana, il tempo richiesto affinché una cellula risalga dallo strato basale in superficie, assumendo le caratteristiche maturative dello strato che attraversa è di 14 giorni; arrivata nello strato corneo la cellula permane ulteriori due settimane e quindi desquama. L'intero ciclo, dalla divisione alla desquamazione, dura dunque 28 giorni circa (Fig.6).



**Figura 6. Programma di differenziamento dei cheratinociti.**

Nell'epidermide sono presenti anche altre cellule con funzioni varie, denominate **cellule ospiti**. Tra queste troviamo i **melanociti** e le **cellule di Langerhans**.

I **melanociti** sono cellule deputate alla produzione di melanina, che, distribuita ai cheratinociti vicini, ne assicura la difesa dai raggi ultravioletti. Le **cellule di Langerhans**, che appartengono al gruppo delle cellule presentanti l'antigene (**APC**), sono come sentinelle che catturano gli agenti estranei. Una volta a contatto con l'antigene, le APC lo inglobano e lo portano al linfonodo, dove lo presentano ad alcune delle cellule di difesa, i **linfociti T**. Questi ultimi reagiscono moltiplicandosi in gran numero, attaccando l'antigene e distruggendolo.

Il **derma**, lo strato intermedio della cute, è il luogo in cui si attivano le reazioni di difesa dell'organismo nei confronti degli agenti patogeni provenienti dall'esterno (batteri, virus, funghi e altri microrganismi e anche agenti chimici e fisici). A differenza dell'epidermide, da cui è separato dalla membrana basale, il derma è riccamente vascolarizzato e innervato. Il derma svolge funzioni di supporto meccanico e metabolico nei confronti dell'epidermide, alla quale trasferisce nutrienti e sebo. L'interfaccia del derma a contatto con l'epidermide assume una forma riccamente ondulata per la presenza di papille dermiche, estroflessioni che hanno lo scopo di inserirsi nelle creste presenti nello strato epidermico sovrastante e favorire così gli scambi metabolici, aumentando la superficie di contatto fra i due tessuti.

L'**ipoderma** è lo strato più profondo della cute e condivide con essa molte funzioni di protezione. Situato al di sotto del derma, è composto in maggioranza da tessuto adiposo, fibre collagene ed elastiche, strutture vascolari e nervose. L'ipoderma funge da deposito di cellule adipose e, grazie all'estrema elasticità, garantisce la libertà di movimento della cute rispetto ai muscoli, nonché l'ammortizzazione degli insulti meccanici.

## ***LA PSORIASI: UNA MALATTIA A BASE IMMUNITARIA***

Ora che sono state definite le basi anatomiche e fisiologiche della cute, indispensabili per comprendere i processi patologici cui può essere sottoposta, si può tornare a parlare di quelle condizioni che caratterizzano la psoriasi.

Il derma, come abbiamo già detto, è colpito da infiammazione, l'epidermide dalle manifestazioni eritemato-squamose.

Le lesioni psoriasiche si presentano, a livello istologico, come zone di iperproliferazione. Le cellule che risalgono l'epidermide hanno un ciclo estremamente più rapido rispetto alla pelle normale, dal momento che si completa in soli 4-5 giorni anziché in 28 (Fig. 7) (Tschacher, 2007).

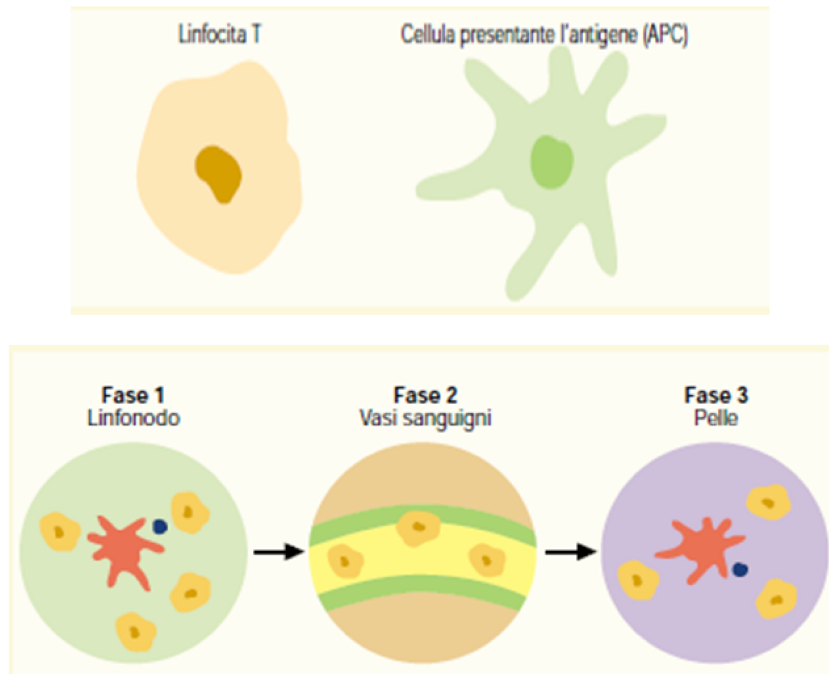


**Figura 7. Differenze istologiche tra cute sana e cute con placca psoriasica.** In questa immagine sono ben evidenti le differenze tra cute sana (A) e cute psoriasica (B). Rispetto alla pelle normale, la cute lesa presenta un notevole aumento di leucociti residenti e reclutati dal circolo ematico; l'ipercheratosi genera le estroflessioni, evidenti nella figura, tipiche della placca psoriasica.

Tale iperproliferazione non è limitata al compartimento basale, dove risiedono le cellule staminali, ma può coinvolgere anche le TAC soprabasali. La maggior parte delle cellule germinative basali, che nell'epidermide normale è perlopiù quiescente, nell'epidermide psoriasica è in attiva proliferazione. Questa popolazione di cellule sembra essere costituita prevalentemente da TAC e da una piccola frazione di cellule staminali (Franssen *et al.*, 2005). Nelle lesioni psoriasiche, inoltre, il percorso di maturazione, significativamente più corto dei cheratinociti, genera un difetto differenziativo che impedisce la completa maturazione di queste cellule e la corretta perdita del nucleo nello strato corneo (paracheratosi). In altre parole, nella psoriasi si assiste all'alterazione del normale equilibrio tra produzione di nuove cellule ed eliminazione di quelle vecchie, e ciò determina l'ispessimento dell'epidermide, caratteristico delle lesioni psoriasiche.

Una delle caratteristiche distintive della psoriasi è la condizione di infiammazione cronica, conseguenza della deregolazione del sistema immunitario, che favorisce l'insorgenza della malattia. È dunque ormai acclarato che i cheratinociti e le cellule infiltranti del sistema immunitario, i linfociti, svolgono un ruolo cooperativo nella formazione delle lesioni. Tuttavia, i meccanismi molecolari che regolano le complesse interazioni fra le due popolazioni cellulari non sono ancora completamente chiari. Quando il processo immunitario che è un naturale meccanismo di difesa, reagisce contro il nostro stesso organismo, si parla di **autoimmunità**. Nel caso della psoriasi, i linfociti T non riconoscono più come proprie le cellule della pelle e le attaccano. Cerchiamo di capire più in dettaglio come questo avviene. Come si vede dalla figura 8, i linfociti T vengono "addestrati" nei linfonodi a riconoscere un certo tipo di antigene (**Fase 1**). Dopo essere stati addestrati, i linfociti T migrano nel sangue, dove esercitano la propria normale funzione di sentinelle (**Fase 2**). Una volta nel sangue, i linfociti escono dai vasi e si dirigono verso la pelle. A questo punto incontrano nuovamente l'antigene, si attivano e reagiscono producendo **citochine**. A contatto con le cellule

dell'epidermide, le citochine ne aumentano la velocità di divisione fino a sette volte (**Fase 3**) mentre nel derma provocano un'inflammazione (Fig. 8).



**Figura 8.** Principali cellule coinvolte nella genesi della psoriasi. Percorso dei linfociti T che addestrati nei linfonodi, migrano attraverso i vasi sanguigni, verso l'epidermide.

La crescita a dismisura degli strati inferiori della pelle fa in modo che le cellule degli strati superiori non abbiano il tempo di maturare completamente. Il risultato finale è l'accumularsi di strati sempre più spessi di cellule, che risultano nella formazione di una **placca**.

I linfociti, che rappresentano gli effettori della risposta autoimmunitaria, nel caso della psoriasi sono prevalentemente di tipo Th1. Essi producono il Fattore di Necrosi Tumorale (**TNF- $\alpha$** ) e l'Interferone gamma (**IFN- $\gamma$** ), due citochine pro-infiammatorie che agiscono da potenti attivatori dell'espressione di molecole di adesione, a loro volta implicate nell'ulteriore reclutamento e attivazione locale delle varie popolazioni leucocitarie e, dunque,

nell'amplificazione del processo infiammatorio. Al reclutamento leucocitario contribuiscono direttamente anche i cheratinociti, tramite il rilascio di numerose chemochine, le molecole in grado di innescare e mantenere la risposta immunitaria. Quale sia l'antigene o l'agente che scatena la risposta immunitaria, ad oggi non è ancora noto, e rimane forse il più importante interrogativo per comprendere le basi molecolari della psoriasi.

Il **TNF- $\alpha$**  svolge un ruolo fondamentale nella patogenesi della psoriasi. Tale citochina multifunzionale è coinvolta in numerosi, importanti processi biologici, quali l'infiammazione, la risposta immunitaria e l'apoptosi (Locksley *et al.*, 2001). Diversi studi hanno dimostrato che nella cute di pazienti con lesioni psoriasiche i livelli di TNF- $\alpha$  sono significativamente più elevati rispetto a quelli che si osservano in cute di soggetti sani (Bachelez *et al.*, 2005; Brian *et al.*, 2007). Il TNF- $\alpha$ , rilasciato localmente dai cheratinociti, è in grado di attivare il Fattore Nucleare kB (NF-kB), specifico per le citochine. È questo un fattore di trascrizione che controlla l'espressione di geni che codificano per citochine pro-infiammatorie e infiammatorie, chemochine e fattori di crescita che stimolano, a loro volta, l'espressione di altre citochine, tra cui il TNF- $\alpha$  stesso. Si genera, pertanto, attraverso un meccanismo a *feedback* positivo, un *loop* infiammatorio che si autoamplifica nella placca psoriasica e crea una condizione di stress ossidativo che cronicizza insieme alla malattia (Briganti *et al.*, 2003; Punzi *et al.*, 2007).

## **DIAGNOSI E CLASSIFICAZIONE DELLA PSORIASI**

Sebbene non esistano criteri standard di valutazione per la diagnosi di psoriasi, esistono alcuni segni morfologici distintivi della patologia che possono condurne all'identificazione (Tab. I).

<b>TIPO di PSORIASI</b>	<b>ASPETTO</b>
<b>Psoriasi a placche 80%</b>	Placche rosse, nettamente marginate, coperta da strati di squame bianco-argenteo; appare più sovente simmetricamente su ginocchia. Gomiti, cuoio capelluto. È il tipo più frequente di psoriasi e, secondo la sede, estensione e gravità assume una denominazione particolare.
<b>Psoriasi guttata 10%</b>	Papule individuali, piccole, rosse e desquamanti; appare più spesso sulla parte superiore del tronco, sugli arti e qualche volta sul cuoio capelluto; meno ispessite e squamose rispetto alla psoriasi a placche. Compare più spesso durante l'infanzia e l'adolescenza ed è frequentemente associata ad infezioni streptococciche, quali la tonsillite o la faringite.
<b>Psoriasi inversa 4%</b>	Aree lisce e asciutte di cute rossa e infiammata; non è presente desquamazione; appare più spesso sulle superfici flessorie (ascelle. Inguine, pieghe sottomammarie, genitali e natiche).
<b>Psoriasi eritrodermica 3%</b>	Macchie grandi, rosse e infiammate estese a gran parte della superficie del corpo. Può essere associata a intenso prurito e bruciore; si sviluppa spesso in pazienti con psoriasi a placche; rara ma molto grave.
<b>Psoriasi pustolosa 3%</b>	Aree di pustole sensibili, contenenti pus, sterili, che possono essere estese o limitate alle mani e ai piedi. Le lesioni possono essere dolorose e invalidanti e sono associate frequentemente al coinvolgimento delle unghie e delle articolazioni.

**Tabella I.** Classificazione clinica della psoriasi.

Nonostante la notevole eterogeneità delle manifestazioni fenotipiche della psoriasi, una prima utile, seppur grossolana, classificazione delle varie forme di questa malattia può basarsi sull'età di insorgenza dei primi sintomi:

-*Psoriasi di tipo 1*, tipica dei pazienti che presentano i primi segni distintivi della malattia prima dei 40 anni;

-*Psoriasi di tipo 2*, tipica dei pazienti che presentano i primi segni dopo i 40 anni e che hanno una maggiore probabilità di sviluppare una malattia di grado severo.

Tale classificazione non tiene però conto dei fattori ambientali e della storia familiare del paziente; è noto, ad esempio, che pazienti con familiarità per la patologia presentano le prime lesioni in età più giovane rispetto a quella dei pazienti in cui la malattia è sporadica (Naldi *et al.*, 2007). Una classificazione più accurata, basata sull'osservazione delle lesioni e sull'estensione dell'area di cute interessata, permette di distinguere le diverse forme di psoriasi attualmente note come segue:

- *Psoriasi a placche*: è la forma più comune di psoriasi. Si presenta con placche ben delineate su palmo della mano, pianta del piede, gomiti, ginocchia e zona interglutea, e solo occasionalmente sui genitali. Le lesioni a carico della cute sono rosse alla base e presentano scaglie argentate alla sommità. La malattia insorge con la comparsa di piccole papule, che poi convergono progressivamente in placche più grandi. Le lesioni hanno una dimensione superiore a 1 cm di diametro e sono ben delineate, con forma da rotonda a ovale e bordi irregolari. Le placche in remissione diventano più chiare, al centro prima e ai bordi poi; lungo i bordi di solito la placca permane più a lungo (Naldi *et al.*, 2007);

- *Psoriasi guttata*: più rara della psoriasi a placche, è caratterizzata, nelle fasi iniziali, da fenomeni di sfaldamento che interessano il tronco e gli arti superiori. Le lesioni appaiono come piccole formazioni a forma di goccia, scarsamente desquamanti. La psoriasi guttata si presenta nel 10% della popolazione dei pazienti e frequentemente compare in giovanissima



età, soprattutto all'interno della stessa famiglia. La comparsa delle prime lesioni è spesso preceduta da infezioni da streptococco o, meno frequentemente, da *Herpes zoster*. Nonostante tale correlazione, l'antigene responsabile della malattia non è stato ad oggi identificato.

-*Psoriasi pustolosa*: è caratterizzata dalla comparsa di lesioni bollose, con un diametro di circa 0.5 cm, che si formano su placche eritematose preesistenti. Con il tempo le pustole diventano scure e desquamano. La pelle si presenta localmente irritata, arrossata e sensibile. La comparsa delle pustole interessa più frequentemente il palmo della mano e la pianta del piede. In alcuni casi la psoriasi a pustole può progredire in psoriasi a placche, in forma localizzata o estesa. L'insorgenza di psoriasi pustolosa è correlata ad infezioni pregresse, stati protratti di stress o contatto con agenti chimici. Il 50% dei pazienti affetti da psoriasi pustolosa presenta anche artrite (Zachariae *et al.*, 1977).

-*Psoriasi eritrodermica*: è la forma più severa di psoriasi, il processo infiammatorio a carico della cute può interessare fino al 100% della superficie corporea. La cute perde completamente le sue funzioni di barriera nei confronti dell'ambiente esterno e di controllo della temperatura corporea. Se non trattata, è l'unica forma di psoriasi che può portare alla morte del paziente, solitamente per sepsi. I fattori associati all'insorgenza di psoriasi eritrodermica includono l'assunzione di corticosteroidi e la prolungata esposizione ai raggi solari (Biondi *et al.*, 1989).

-*Psoriasi eruttiva*: è molto comune in bambini e adolescenti, e si sviluppa con piccole placche eritematose che di frequente si manifestano dopo polmoniti da streptococco  $\beta$ -emolitico.

-*Psoriasi invertita (o inversa)*: le lesioni si presentano con localizzazione invertita rispetto alle forme più comuni, ovvero a livello delle pliche cutanee. In questo caso i sintomi, specie il bruciore ed il rossore, sono acuiti dalla sudorazione e dall'attrito che si genera dal contatto con gli indumenti.

Va, infine, sottolineata, la comparsa di artrite, una patologia caratterizzata da uno stato infiammatorio esteso a tendini e articolazioni con dolori e deficit funzionali, che è preceduta nel 75% dei casi da una forma di psoriasi.

### ***TERAPIE FARMACOLOGICHE***

La scelta del farmaco idoneo al trattamento della psoriasi, così come la scelta della via di somministrazione, dipendono essenzialmente dal grado di severità della malattia e dalla storia clinica del paziente, con particolare riguardo alla presenza di comorbidità. Una prima classificazione delle possibili terapie, di carattere generale, è la seguente:

*-Trattamento topico:* è il trattamento di elezione nei casi meno gravi di psoriasi. Consiste nell'applicazione diretta sulla cute lesionale di creme o pomate contenenti farmaci ad azione antinfiammatoria (corticosteroidi, vitamina D3 e suoi analoghi, antralina).

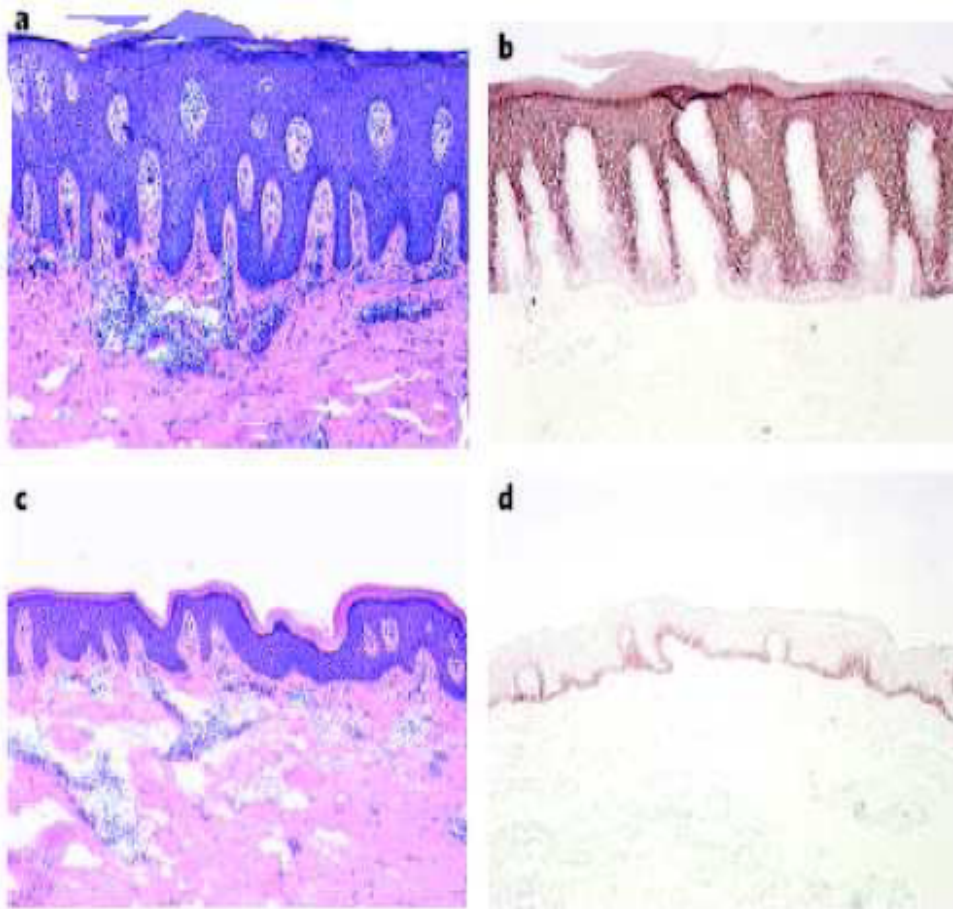
*-Fototerapia:* consiste nell'irradiazione locale o sistemica con luce UV ed è in grado di ridurre significativamente l'estensione, lo spessore e l'eritema delle placche, modulando la risposta immunitaria cutanea. Studi sull'uomo e sugli animali hanno dimostrato che gli UVB determinano una diminuzione della sintesi del DNA, dell'RNA e delle proteine: si pensa che questi eventi siano accompagnati da una temporanea normalizzazione della cinetica cellulare, soprattutto dei cheratinociti psoriasici; ciò spiegherebbe almeno in parte gli effetti terapeutici degli UV. Il trattamento fototerapico attualmente più diffuso sfrutta la banda dell' UVB con lunghezza d'onda tra 309 e 313 nm. In queste condizioni si ottiene il miglior rapporto tra l'efficacia terapeutica e l'entità degli effetti collaterali.

*-Terapia sistemica:* implica l'assunzione di farmaci, per via orale o parenterale, che esplicano la loro azione direttamente o indirettamente sul sistema immunitario. Il ricorso alla terapia sistemica è richiesto nei casi più gravi. Le molecole più utilizzate includono il metotressato e la ciclosporina.

Nei casi in cui la somministrazione dei farmaci utilizzati nella terapia sistemica sia controindicata o si riveli inefficace, è possibile ricorrere ai farmaci di ultima generazione, costituiti da anticorpi monoclonali diretti contro i principali effettori della risposta infiammatoria (Martin *et al.*, 2001). Tale terapia, indicata come *terapia biologica* o *immunoterapia*, ha permesso un notevole miglioramento della qualità della vita dei pazienti resistenti a forme diverse di trattamento (Figura 9), sebbene gli effetti collaterali siano talvolta severi. Gli immunoterapici più usati sono gli inibitori del TNF- $\alpha$ ; a questa categoria appartengono l'*infliximab*, l'*adalimumab* e l'*etanercept*.

Altri farmaci biologici hanno, invece, come bersaglio famiglie specifiche di proteine di membrana di linfociti T (tra cui CD11), che mediano non solo l'infiammazione, ma anche l'infiltrazione linfocitaria nella cute; fra questi possiamo citare l'*efalizumab*, in uso negli Stati Uniti.

Molti degli effetti secondari associati a terapie farmacologiche che utilizzano farmaci biologici sono ancora poco noti a causa della loro recente introduzione, e non è ancora possibile escludere effetti collaterali a lungo termine.



**Figura 9. Effetti della terapia sistemica con farmaci biologici.** In **a** e **b** sono mostrati particolari di lesioni psoriasiche prima del trattamento farmacologico. In **c** e **d**, le stesse lesioni dopo 12 settimane di trattamento con terapia biologica. Dal confronto emerge una notevole riduzione dell'ispessimento epidermico.

## **I LINEA SPERIMENTALE**

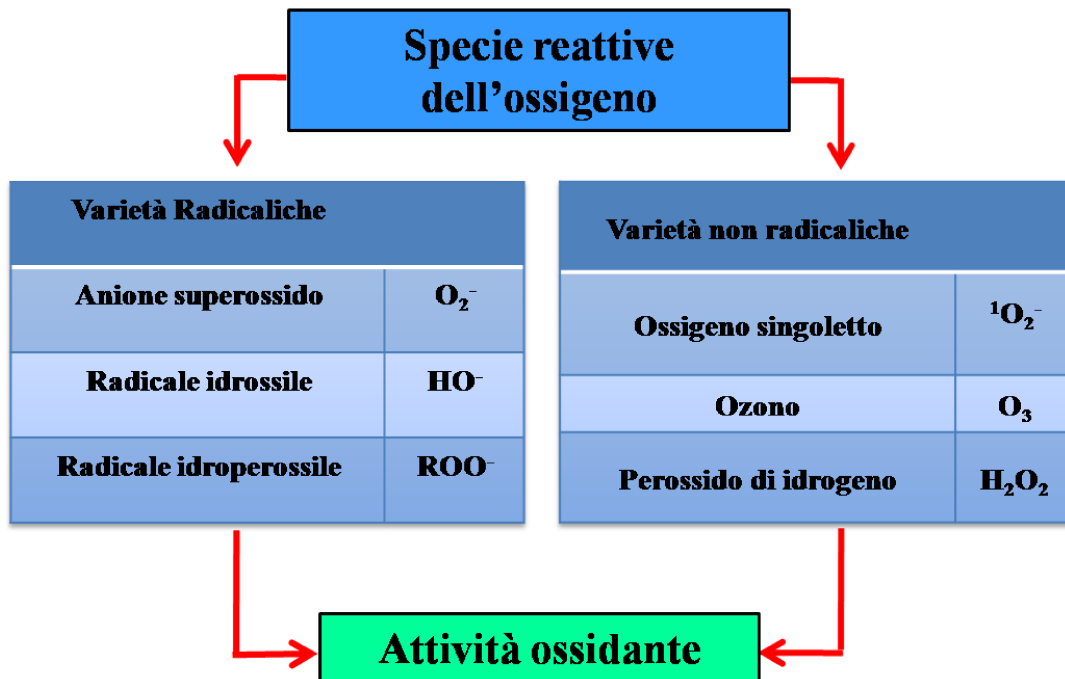
### ***DEAMIDAZIONE DELLE ASPARAGINE IN PROTEINE DELLA MEMBRANA ERITROCITARIA DI PAZIENTI AFFETTI DA PSORIASI A PLACCHE.***

#### **STRESS OSSIDATIVO**

Un evento di “*stress* ossidativo” si verifica all’interno della cellula quando le difese antiossidanti non sono in grado di contrastare efficacemente la produzione di specie reattive dell’ossigeno (ROS), siano esse di origine esogena o endogena (Briganti *et al.*, 2003). Uno squilibrio tra la produzione di radicali liberi e la capacità della loro neutralizzazione da parte del sistema antiossidante può dunque provocare danni delle macromolecole cellulari, con la conseguente compromissione della funzionalità e della vitalità delle cellule stesse (Figura 10). Sebbene la maggior parte dei ROS sia di origine endogena, poiché prodotta da processi metabolici cellulari, tali specie possono generarsi anche in seguito ad interazioni con l’ambiente esterno: l’irradiazione con raggi UV o l’esposizione ad agenti xenobiotici (farmaci o droghe), sono solo alcuni esempi dei processi che incrementano la produzione di ROS.

I radicali liberi si definiscono come “specie chimiche contenenti uno o più elettroni spaiati nell’orbitale più esterno e capaci di esistenza indipendente” (Pryor 1976). Si tratta di specie estremamente instabili, dal momento che tendono a condividere il proprio elettrone spaiato con uno di spin opposto presente in un altro orbitale. Tale instabilità, che si traduce in una elevata reattività, viene trasmessa alle molecole limitrofe in un processo che si autoamplifica. Allo scopo di mantenere l’integrità delle proprie strutture, la cellula ha evoluto un complesso macchinario di difesa antiossidante, di natura sia enzimatica che non, preposto alla

metabolizzazione di varie specie reattive dell'ossigeno e dei prodotti derivanti dall'ossidazione di vari costituenti cellulari.



**Figura 10. I ROS.** Lo schema mostra le principali specie reattive dell'ossigeno.

Tra i sistemi di difesa (*scavenger*) di natura enzimatica, è possibile annoverare un gruppo di enzimi capaci di agire in maniera concertata e sequenziale nel processo di rimozione delle specie radicaliche. Tra questi abbiamo la *superossido dismutasi* (SOD), la *glutathione perossidasi* (GPx) e la *catalasi* (CAT). I sistemi non-enzimatici di detossificazione sono invece costituiti da composti a basso peso molecolare in grado di interferire con la diffusione di reazioni radicaliche, dannose all'interno della cellula, trasformandosi essi stessi in radicali, relativamente più stabili. Gli *scavenges* non-enzimatici includono l' $\alpha$ -tocoferolo (vitamina E), l'acido ascorbico, il glutathione e i carotenoidi.

## ***STRESS OSSIDATIVO E PSORIASI***

Numerose evidenze, apparse in letteratura nel corso degli anni, hanno dimostrato il ruolo cruciale dei radicali liberi nella patogenesi di malattie molto diverse fra loro, tra cui patologie di tipo neurologico, cardiovascolare, infiammatorio e malattie autoimmuni. Anche nella psoriasi, lo stress ossidativo contribuisce alla patogenesi della malattia ed è uno dei fattori che determinano la severità dei sintomi. Nella psoriasi è, infatti, ampiamente descritto l'instaurarsi di un ambiente ossidante, sia a livello sistemico che a livello della placca. Tale condizione è dovuta al massivo rilascio di ROS da parte delle cellule del sistema immunitario, in particolare dai neutrofili, che è caratteristico del processo infiammatorio ed è mediato dall'aumento nella produzione di citochine, soprattutto di TNF- $\alpha$  (Young *et al.*, 2007). In particolare, l'eccessiva produzione di O<sub>2</sub><sup>-</sup> (anione superossido) e/o di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (perossido di idrogeno) è sufficiente ad alterare l'equilibrio ossido-riduttivo della cellula e a favorire un aumento dei danni ossidativi a carico del DNA, delle proteine e delle membrane biologiche. Lo stesso rilascio delle citochine è sotto il controllo dei ROS; è infatti noto il meccanismo secondo cui l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, così come il TNF- $\alpha$ , è in grado di attivare l'NF- $\kappa$ B, che stimola la trascrizione dei geni che codificano per citochine, chemochine e fattori di crescita proinfiammatori e infiammatori. L'eccesso di radicali liberi che non viene efficacemente neutralizzato dalle difese antiossidanti è libero di interagire con i costituenti cellulari e indurre la formazione di nuovi radicali liberi a partire dalle molecole bersaglio che, a loro volta, potranno dar luogo a nuove reazioni radicaliche. Qualunque molecola, all'interno della cellula o nella matrice extracellulare, può essere coinvolta in reazioni radicaliche, sebbene soprattutto le reazioni che coinvolgono acidi nucleici, acidi grassi polinsaturi e proteine rivestono particolare importanza da un punto di vista patogenetico. In condizioni normali, la cute attiva i meccanismi di difesa antiossidanti per sopperire ad eventuali danni; nella psoriasi, così come in altri disturbi infiammatori a carico della pelle, le difese antiossidanti sono drasticamente

diminuite. Rispetto alla pelle normale, infatti, la cute psoriasica presenta livelli più bassi SOD, GPx di acido ascorbico (Briganti *et al.*, 2003).

## **DEAMIDAZIONE DELLE PROTEINE E PROCESSO DI RIPARAZIONE DEI RESIDUI ISOASPARTILICI**

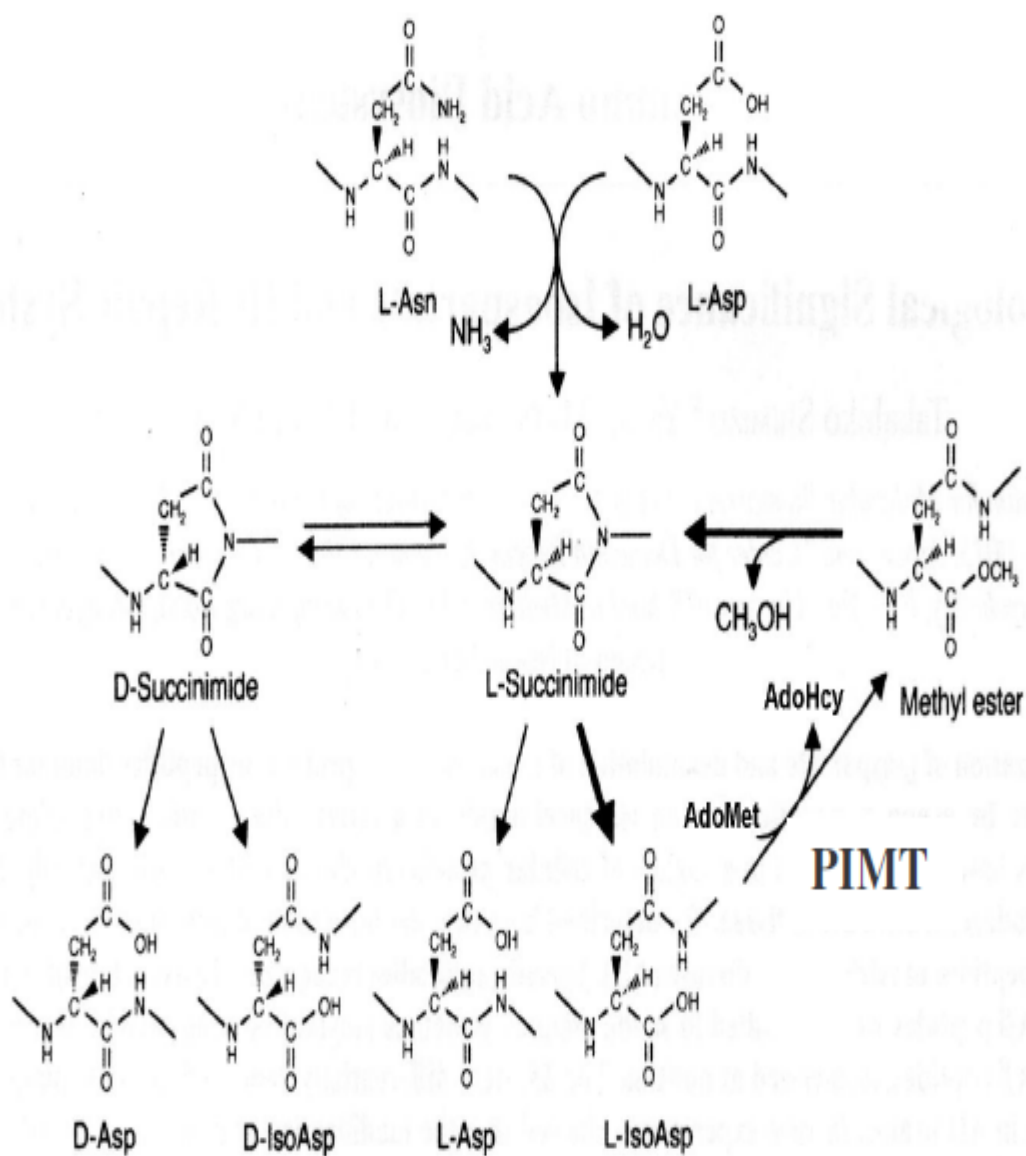
### ***DEAMIDAZIONE DI RESIDUI DI ASPARAGINA***

Diversi sono i meccanismi attraverso i quali i ROS esplicano i loro effetti dannosi sulle proteine. Essi comprendono formazione di legami crociati tra proteine diverse, processi di frammentazione della catena polipeptidica stessa, nonché reazioni di ossidazione a carico delle catene laterali aminoacidiche. Tali alterazioni sono mediate prevalentemente dal radicale idrossile, anche se fattori determinanti sono altresì rappresentati dalla disponibilità di ossigeno e di metalli di transizione (Davies 2005; Farout *et al.*, 2006). Un importante tipo di danno molecolare cui le proteine possono essere sottoposte per effetto di uno *stress* ossidativo coinvolge residui di asparagina e/o di aspartato localizzati nell'ambito di sequenze aminoacidiche particolarmente prone a subire riarrangiamenti che culminano nella formazione di legami isopeptidici. Sebbene si tratti di una modifica *post-biosintetica* cui le proteine vanno fisiologicamente incontro nel corso dell'invecchiamento molecolare, il suo procedere sembra essere particolarmente favorito da varie condizioni di *stress* cellulare (tra cui lo *stress* ossidativo) (Ingrosso *et al.*, 2000).



### **FORMAZIONE DI RESIDUI ASPARTILICI ANOMALI**

La reazione di deamidazione di figura 11 comporta la formazione di un intermedio ciclico di tipo succinimmidico, che si forma in seguito all'attacco nucleofilo da parte dell'atomo di azoto peptidico del residuo  $\text{Asn}^{+1}$  sul carbonio carbonilico in  $\beta$  della catena laterale del residuo asparaginic, con eliminazione di una molecola di ammoniac. L'intermedio succinimmidico, essendo un anello a 5 termini, è piuttosto instabile, pertanto, subisce rapida idrolisi da una parte o dall'altra dell'atomo di azoto, generando due possibili prodotti: un isopeptide anomalo o un L-asartil peptide, rispettivamente nel rapporto di 7:3 (Barber *et al.*, 1989). Meno frequentemente l'intermedio succinimmidico si può formare in seguito a deidratazione di un residuo di L-Asp. In questo caso la reazione avviene per attacco nucleofilo dell'atomo di azoto del legame peptidico sul carbonio carbossilico in catena laterale di un residuo adiacente di Asp, portando nuovamente alla formazione dell'anello succinimmidico, con liberazione di una molecola di acqua. In aggiunta, il carbonio chirale in  $\alpha$  può facilmente racemizzare e dare origine alla D-succimmide che, in seguito all'idrolisi, genera peptidi contenenti residui di D-Asp e di D-isoAsp (Radkiewicz *et al.*, 2001). In sintesi, a partire da residui di L-Asp e di L-Asn si possono generare residui di L-isoaspartato e D-isoaspartato, nonché gli intermedi instabili D- ed L-succimmide. Tra questi, l'L-isoaspartato rappresenta, in ogni caso, la forma predominante.



**Figura 11. Meccanismi di formazione di residui aspartilici anomali.** Lo schema rappresenta i meccanismi di formazione di residui aspartilici anomali, in seguito al processo di deamidazione (e/o isomerizzazione) dell'Asn o di deidratazione dell'Asp. Nella parte inferiore è mostrato il meccanismo di riparazione mediato dalla PIMT.

La sequenza aminoacidica gioca un ruolo critico nel determinare la propensione alla formazione della succinimmide; è stato infatti dimostrato che la deamidazione risulta favorita se l'Asn è seguita da residui a catena laterale piccola e idrofila come glicina (Gly), serina (Ser) o istidina (His). Sequenze del tipo Asn-Gly, Asn-His e Asp-Gly rappresentano, infatti, i cosiddetti “punti caldi” di una proteina nei confronti della reazione di deamidazione (Mc Fadden *et al.*, 1987). Residui a catena laterale idrofobica ed ingombrante in posizione Asn<sup>+1</sup>, invece, riducono drasticamente la propensione a questo tipo di reazione. Anche la conformazione della proteina può influenzare la tendenza alla deamidazione; è stato infatti osservato che la formazione di isoaspartili avviene prevalentemente nell'ambito di sequenze peptidiche flessibili. Inoltre, è emerso che nel corso dell'evoluzione, la presenza di residui con catena laterale piccola appare sfavorita, rispetto a residui più ingombranti, nell'occupare la posizione di sequenza Asn<sup>+1</sup>. Quindi, sia i determinanti di sequenza sia i fattori di impedimento sterico concorrono a proteggere i residui asparaginici dalla deamidazione. Diversi sono i fattori che possono favorire l'alterazione delle proteine sui residui aspartilici e/o asparaginilici: fattori ambientali di vario tipo come shock termico, osmotico ed ossidativo e l'esposizione ad agenti fotochimici (D'Angelo *et al.*, 2001).

### ***PROCESSO DI RIPARAZIONE DEI LEGAMI ISOPEPTIDICI***

Evidenze sperimentali dimostrano come la comparsa di residui aspartilici anomali possa provocare severe alterazioni strutturali a carico delle proteine, compromettendone significativamente la loro attività biologica (Inaba *et al.*, 1992; Reissner *et al.* 2006; Cimmino *et al.*, 2008). Per questa ragione, e perché la reazione di deamidazione di residui asparaginilici rappresenta un evento post- biosintetico relativamente frequente, soprattutto in proteine con scarso *turnover*, esiste in tutte le cellule procariotiche ed eucariotiche una specifica metiltrasferasi, la L-isoaspartato-(Daspartato)-O-metiltrasferasi (**PIMT**) che, selettivamente,

riconosce e ripara i legami isopeptidici derivanti sia da reazioni di deamidazione di asparagine che di isomerizzazione di aspartati, e ne catalizza la conversione in residui aspartilici normali. Il modello murino *pimt*<sup>-/-</sup> (ko) mostra un significativo ritardo nella crescita e ridotta sopravvivenza; la morte è generalmente causata dall'insorgenza di crisi epilettiche. In particolare, esperimenti di proteomica condotti su estratti di cervello di topi ko hanno permesso di identificare le proteine che sono più suscettibili all'accumulo di residui isoaspartilici. La maggior parte di esse, espresse principalmente o esclusivamente a livello cerebrale, sono state associate alla comparsa delle anomalie di tipo neurologico che caratterizzano il topo ko (Zhu *et al.*, 2006; Vigneswara *et al.*, 2006). Tali risultati consolidano ulteriormente l'importanza del ruolo della PIMT del sistema nervoso centrale.

### ***CARATTERISTICHE DELLA PROTEINA E STRUTTURA DEL GENE DELLA PIMT DI TIPO II***

La PIMT umana è una proteina di 25 kDa, codificata da un gene localizzato sul cromosoma 6. Sebbene espressa in tutti i tessuti, questa proteina mostra i più alti livelli di attività nei globuli rossi e nel tessuto nervoso. Sono stati isolati due isoenzimi principali, di 226 e 227 residui rispettivamente (Ingrosso *et al.*, 1989), ed un isoenzima minore (Ingrosso *et al.*, 1991). Gli isoenzimi si differenziano non solo per la dimensione, ma anche per il punto isoelettrico, conseguenza della diversa sequenza aminoacidica nella regione C-terminale. La caratterizzazione strutturale della PIMT ha condotto all'identificazione di tre regioni *consensus* altamente conservate in un gran numero di metiltrasferasi AdoMet-dipendenti, sia di origine procariotica che eucariotica. Queste regioni, definite *motivi I, II e III*, sono disposte lungo la catena polipeptidica sempre nello stesso ordine e sono separate da regioni spaziatrici di lunghezza analoga. È stato proposto che tali motivi strutturali corrispondano alle regioni

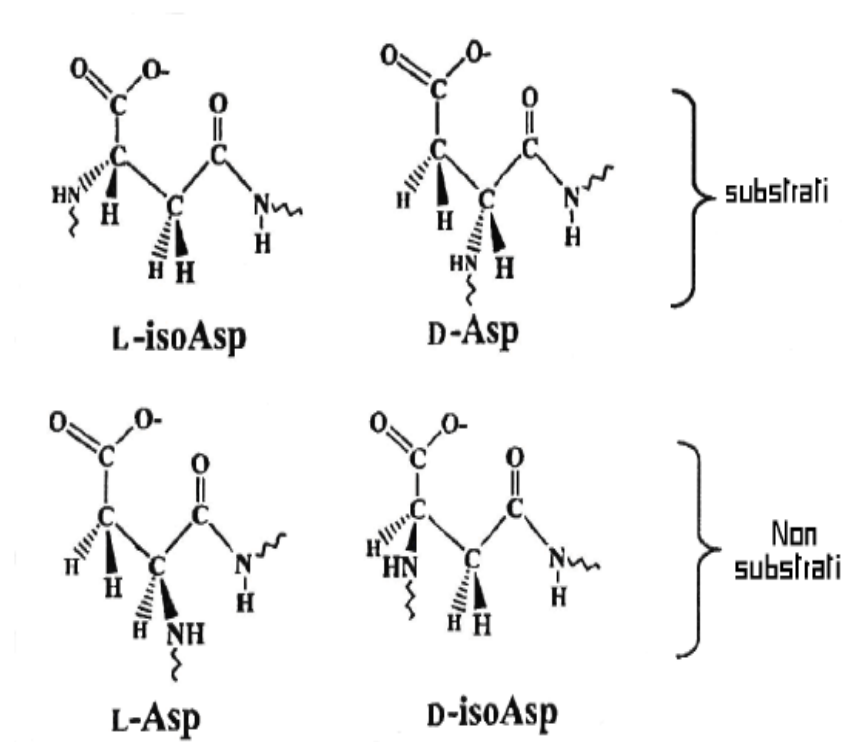
impegnate nel *binding* con l'AdoMet o, alternativamente, rappresentino regioni importanti nel determinare l'organizzazione tridimensionale della proteina.

### ***MECCANISMO DI RIPARAZIONE MEDIATO DALLA METILESTERIFICAZIONE ENZIMATICA***

Evidenze sperimentali *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato che la PIMT di tipo II è in grado di riparare i danni molecolari derivanti dalla deamidazione di Asn e/o dall'isomerizzazione di Asp, convertendo residui alterati di L-isoAsp e D-Asp in residui di L-Asp (Johnson *et al.*, 1987; Galletti *et al.*, 1995). L'enzima non è invece in grado di riconoscere e metilare residui di L-Asp e di D-isoAsp (figura 12). Ciò dipende dall'orientamento spaziale dei gruppi coinvolti nel legame al sito attivo dell'enzima. Infatti, nei residui di D-Asp e di L-isoAsp la stereochimica del carbonio in  $\alpha$  è tale che l'enzima può legare il peptide contenente il residuo anomalo e la catalasi può procedere.

Nei residui di L-Asp e di D-isoAsp l'orientamento degli atomi coinvolti nella reazione preclude l'interazione con l'enzima, impedendo in tal modo alla reazione di procedere (Clarke, 2003). La PIMT può inoltre, essa stessa, andare incontro ad un processo di deamidazione/ isomerizzazione in corrispondenza dei residui Asn<sup>188</sup> e Asp<sup>217</sup>; mediante un meccanismo di metilazione/riparazione "auto-catalizzato", l'enzima è in grado di preservare la propria attività e garantire l'efficienza del processo di riparazione. La reazione di metilazione enzimatica S-adenosilmetionina (AdoMet)- dipendente, catalizzata dalla PIMT, comporta la formazione di un metilestere, a livello del gruppo  $\alpha$ -carbossilico libero del residuo isoaspartilico anomalo. Una volta attivato, il metilestere si idrolizza rapidamente, formando lo stesso intermedio succinimmidico coinvolto nella deamidazione e liberando il metile sottoforma di metanolo. La successiva idrolisi spontanea dell'anello succinimmidico conduce alla formazione di peptidi contenenti residui isoaspartilici e aspartilici

rispettivamente nel rapporto di 7:3. Quindi, attraverso un singolo ciclo di metilazione, solo il 30% degli isopeptidi viene riparato: occorreranno ripetuti cicli di metilazione/demetilazione per avere il ripristino della normale struttura dello scheletro polipeptidico.



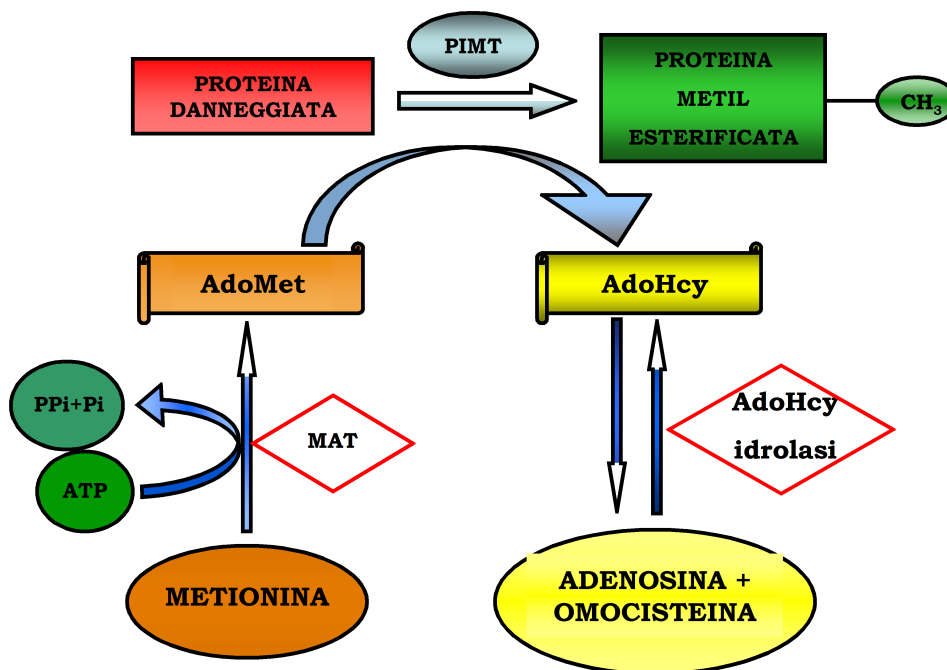
**Figura 12. Struttura chimica dei substrati e dei “non substrati” della PIMT** La figura mostra la struttura e la chiralità dei substrati fisiologici della PIMT (L-isoAsp e D-Asp) e dei residui L-Asp e D-isoAsp, che non sono invece riconosciuti come substrati dell’enzima.

Va sottolineato che la PIMT catalizza la reazione di conversione di residui di isoAsp indipendentemente dal fatto che essi abbiano avuto origine dalla isomerizzazione di un Asp o dalla deamidazione di una Asn. Pertanto, mentre nel primo caso si ha un riassetto completo dello scheletro peptidico originario, nel secondo caso il ripristino è solo parziale. Sebbene un tale meccanismo di riparazione non porti alla rigenerazione dell’Asn, residuo originariamente

presente nella sequenza aminoacidica, la conversione di residui isoaspartilici in residui aspartilici risulta comunque sufficiente a garantire un recupero di attività della proteina danneggiata pari all'80%.

### ***L'ERITROCITA COME MODELLO SPERIMENTALE PER LO STUDIO DELLA PIMT***

Gli eritrociti rappresentano un modello cellulare ideale per lo studio delle modifiche post-biosintetiche, sia spontanee che enzimatiche, cui le proteine sono fisiologicamente sottoposte nel corso della loro permanenza intracellulare. L'eritrocita è infatti contraddistinto da un metabolismo semplificato, è privo di nucleo e di organelli cellulari ed è dotato di una parete cellulare unicamente rappresentato dalla membrana plasmatica. L'eritrocita non ha possibilità di effettuare sintesi proteica, pertanto non può rimpiazzare, con proteine di nuova sintesi, il suo patrimonio proteico che, di conseguenza, è particolarmente pronò all'accumulo di danni da "fatica molecolare", inclusa la deamidazione di residui di asparagina. Le proteine modificate dalla deamidazione sono riconosciute dalla PIMT, che a sua volta ne attiva la riparazione utilizzando come donatore di gruppi metilici l'AdoMet (figura 13), la cui biosintesi è estremamente efficiente nel citoplasma dell'eritrocita maturo. In aggiunta, in queste cellule si registra un'attività metiltrasferasica che risulta tra le più alte fra le cellule eucariotiche. E' stato, infatti, dimostrato che l'AdoMet prodotta nel globulo rosso viene utilizzata per oltre il 90% nella reazione di metil-esterificazione catalizzata dalla PIMT (Freitag *et al.*, 1981).



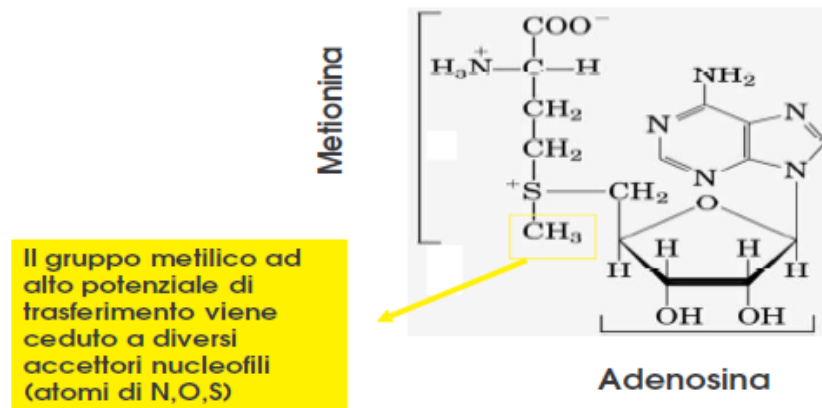
**Figura 13. Reazione di metilesterificazione catalizzata dalla PIMT nel globulo rosso.** La figura mostra, schematicamente, il meccanismo di riparazione dei legami isopeptidici mediato dalla metilesterificazione del residuo danneggiato operata dalla PIMT. L'AdoHcy, il prodotto demetilato dell'AdoMet, è idrolizzato in adenosina e omocisteina dalla reazione catalizzata dall'enzima AdoHcy idrolasi.

### ***IL METABOLISMO DEGLI AMINOACIDI SOLFORATI E LE REAZIONI DI TRANSMETILAZIONE***

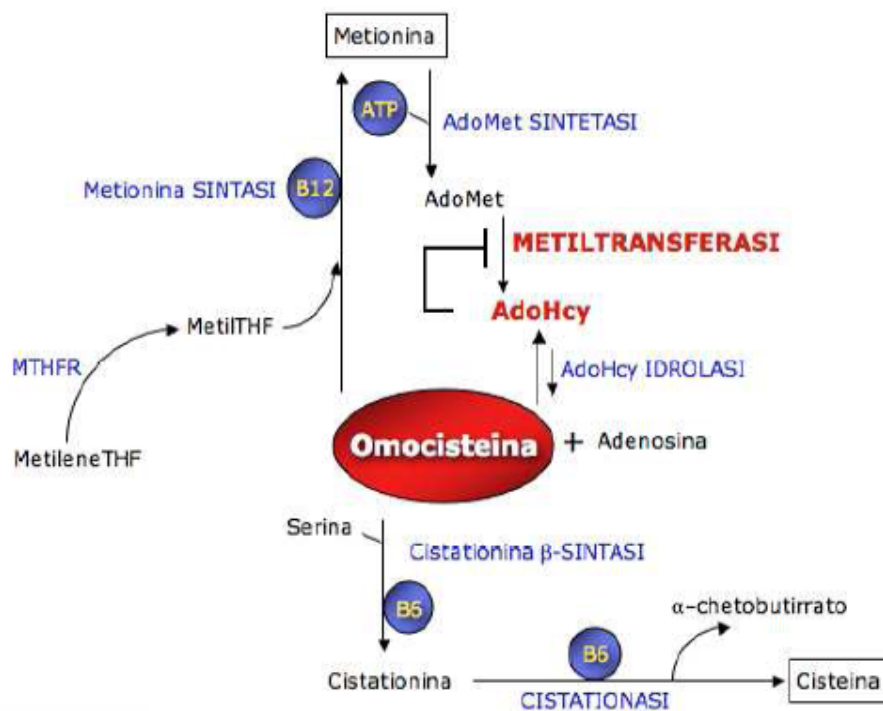
Le reazioni di *transmetilazione* consistono nel trasferimento di un gruppo metilico dalla AdoMet ad un substrato accettore. Nei mammiferi, più di 40 differenti enzimi catalizzano oltre 100 reazioni in cui il gruppo -CH<sub>3</sub> è trasferito ad atomi di ossigeno, azoto o zolfo di svariate molecole, che includono acidi nucleici, proteine, neurotrasmettitori e fosfolipidi (Cheng *et al.*, 1999; Chiang *et al.*, 1996). L'AdoMet (figura 14) è un nucleoside solforato caratterizzato da un gruppo metilico ad alto potenziale di trasferimento, e si origina dall'adenosilazione ATP-dipendente di una molecola di metionina. Tale reazione, che rappresenta il primo evento del ciclo metabolico della metionina (figura 15), è catalizzata



dalla L-Metionina-S-AdenosilTrasferasi (MAT), un enzima espresso in maniera tessuto-specifica e finemente regolato dalle condizioni metaboliche della cellula.



**Figura 14. Struttura chimica del nucleoside solforato AdoMet** Nella figura è evidenziato in giallo il gruppo metilico ad alto potenziale di trasferimento.



**Figura 15. Il ciclo della metionina.** In questo schema è riportato il ciclo di reazioni che partono dalla sintesi della metionina.

Il trasferimento del gruppo metilico dal donatore all'accettore genera, oltre al substrato metilato, S-adenosilomocisteina (AdoHcy), il prodotto demetilato dell'AdoMet. Questa molecola rappresenta un potente inibitore competitivo delle varie metiltrasferasi cellulari e può, pertanto, regolare le reazioni di metilazione secondo un meccanismo da inibizione da prodotto. Le reazioni di metilazione sono dunque modulate *in vivo* sia dal rapporto  $[AdoMet]/[AdoHcy]$ , definito "*potenziale di transmetilazione*", che dai valori relativi di  $K_m$  e  $K_i$  delle singole metiltrasferasi nei confronti, rispettivamente, del donatore di metili e dell'inibitore. In condizioni fisiologiche, l'inibizione delle metiltrasferasi da parte dell'AdoHcy è prevenuta dalla rapida idrolisi di tale molecola in adenosina ed Hcy (omocisteina), operata dall'enzima AdoHcy idrolasi, in una reazione completamente reversibile. Benché da un punto di vista termodinamico l'AdoHcy idrolasi favorisca la sintesi dell'AdoHcy piuttosto che la sua idrolisi, la pronta rimozione dell'Hcy impedisce l'accumulo dell'inibitore e, indirettamente, preserva l'efficienza delle reazioni di metilazione.

L'Hcy è rimossa *in vivo* attraverso due vie alternative, quantitativamente equivalenti a digiuno: la rimetilazione a metionina e la *transsulfurazione* a cisteina. La rimetilazione dell'Hcy a metionina è catalizzata dall'enzima metionina sintasi, che utilizza la vitamina B12 come cofattore e il 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF) come donatore di gruppi metilici. Una reazione alternativa, catalizzata dalla betaina-omocisteina metiltrasferasi, prevede l'utilizzo, quale donatore del gruppo metilico, della betaina. La *transsulfurazione* a cisteina è invece un processo a due tappe, la prima delle quali è catalizzata dalla cistationina  $\beta$ -sintasi. Questo enzima utilizza quale cofattore il piridossalfosfato (PLP), derivato dalla vitamina B6, e produce cistationina a partire da Hcy e serina. La cistationina è quindi idrolizzata a cisteina e  $\alpha$ -chetobutirrato dalla cistationinasi, un secondo enzima anch'esso PLP-dipendente.

## ***EFFETTI PRODOTTI DALL'ALTERAZIONE DEL NORMALE METABOLISMO DEGLI AMINOACIDI SOLFORATI***

Un'indicazione dell'importanza biologica delle reazioni di *transmetilazione* AdoMet-dipendenti viene già dalla loro numerosità e dalla varietà di processi cellulari in cui tali reazioni sono coinvolte. La riparazione di proteine danneggiate, il mantenimento dell'integrità strutturale delle membrane cellulari, la sintesi e l'inattivazione di neurotrasmettitori catecolamminici e la sintesi delle poliammide sono solo alcuni dei molteplici processi biologici che richiedono reazioni di *transmetilazione*. Il prodotto demetilato dell'AdoMet, l'AdoHcy, è un potente inibitore competitivo di tutte le reazioni di *transmetilazione*. Il rapporto  $[AdoMet]/[AdoHcy]$ , denominato potenziale di *transmetilazione*, è spesso impiegato come indicatore della capacità metiltrasferasica cellulare (Cantoni *et al.*, 1985). Molti studi hanno evidenziato il ruolo della deplezione di AdoMet come il principale effettore della riduzione del potenziale di *transmetilazione* e della conseguente alterazione della capacità metiltrasferasica cellulare (Loehrer *et al.*, 1996; Lathrop Stern *et al.*, 2000). Studi più recenti condotti da Yi e colleghi hanno tuttavia dimostrato l'esistenza di una correlazione positiva tra i livelli plasmatici di AdoHcy e la ipometilazione del DNA linfocitario, mentre nessuna associazione è stata trovata con la concentrazione di AdoMet, come se l'aumento della concentrazione di AdoHcy fosse più efficace rispetto alla riduzione dei livelli di AdoMet, nel compromettere lo *status* di metilazione cellulare (Yi *et al.*, 2000). L'importanza del ruolo dell'Hcy e del suo precursore AdoHcy nell'indurre tali effetti è sottolineato anche dal fatto che le alterazioni osservate regrediscono in seguito al trattamento con il folato. Ciò accade poiché, essendo il metil-tetraidrofolato il donatore di metili nella reazione di rimetilazione dell'Hcy a Met, è aumentata la biodisponibilità di AdoMet e quindi il rapporto  $[AdoMet]/[AdoHcy]$  viene modificato a favore del donatore di metili (Ingrosso *et al.*, 2003).

## ***PSORIASI E IPEROMOCISTEINEMIA***

L'iperomocisteinemia è un disordine dismetabolico che consiste nell'aumento delle concentrazioni plasmatiche di Hcy totale (tHcy) al di sopra di valori soglia, stabiliti in 8-10  $\mu\text{M}$  nelle femmine e 10-12  $\mu\text{M}$  nei maschi. L'Hcy è un aminoacido solforato non proteico, che si trova nel plasma in minima parte in forma libera (<10%), soprattutto in forma di omodimeri Hcy-Hcy o, più comunemente, in forma di disolfuri misti omocisteinil-cisteina. Più del 90% di Hcy è invece legato a proteine di trasporto, principalmente all'albumina. La somma dell' Hcy libera e di quella legata a proteine costituisce la tHcy plasmatica. Come descritto in precedenza, le concentrazioni plasmatiche di Hcy sono finemente regolate da meccanismi omeostatici a cui prendono parte numerosi enzimi e cofattori essenziali. Quando tali meccanismi falliscono e la concentrazione di Hcy aumenta, si instaura una condizione dismetabolica, definita "iperomocisteinemia", che costituisce un potente fattore di rischio di malattia cardiovascolare di tipo aterotrombotico, *stroke* e vasculopatia ostruttiva periferica arteriosa e venosa (Vanizoret *et al.*, 2003). Diversi sono i fattori che possono causare iperomocisteinemia: età e sesso, abitudini nutrizionali, mutazioni genetiche, assunzione di specifici farmaci, tra cui il metotressato. L'iperomocisteinemia può inoltre presentarsi come complicanza frequente di altre patologie, quali ad esempio l'insufficienza renale cronica, una condizione caratterizzata da una precoce mortalità cardiovascolare che è, nei soggetti giovani, circa dieci volte superiore a quella della popolazione normale (Dierkes *et al.*, 2001). Evidenze recentemente apparse in letteratura indicano che anche in pazienti affetti da psoriasi a placche si assiste ad un moderato aumento della concentrazione plasmatica di Hcy rispetto alla popolazione di controllo. I livelli plasmatici di acido folico, al contrario, nei pazienti risultano inferiori rispetto ai valori di controllo (Malerba M. *et al.*, 2006). Negli individui psoriasici, inoltre, le concentrazioni plasmatiche di Hcy sembrano correlare positivamente con il grado di severità della patologia e negativamente con i livelli di acido folico.

## LA METILAZIONE DEL DNA

La metilazione del DNA è il fenomeno epigenetico più diffuso, dal momento che è riscontrabile nel genoma di quasi tutti gli organismi viventi. Negli eucarioti la metilazione non interessa indistintamente tutte le citosine, ma soltanto quelle che appartengono a dinucleotidi CpG. Circa il 60-80% dei dinucleotidi CpG del genoma umano è metilato su entrambi i filamenti; la maggior parte dei dinucleotidi metilati è associata a trasposoni, ovvero segmenti genomici che, se attivi, sono in grado di cambiare la loro posizione genomica. Le sequenze CpG non metilate non sono distribuite uniformemente lungo tutto il genoma, ma sono raggruppate in blocchi discreti, definiti “isole CpG”, in cui la frequenza di dinucleotidi CpG è maggiore di quella attesa e non inferiore al 50%; tali raggruppamenti sono generalmente associati alle regioni promotrici di molti geni costitutivi e di alcuni geni tessuto-specifici. La grande maggioranza delle isole CpG è demetilata nel corso di tutti gli stadi dello sviluppo e in tutti i tessuti; durante lo sviluppo una percentuale di esse, minoritaria, ma significativa, viene metilata, e quando questo accade, il promotore associato diventa stabilmente represso. Questo tipo di regolazione è alla base di fenomeni di cruciale importanza per la cellula, tra cui l'*imprinting* genomico, l'inattivazione del cromosoma X nelle femmine di mammifero, la memoria cellulare, il differenziamento e la stabilità del genoma. Gli enzimi responsabili della metilazione del DNA sono le DNA metiltrasferasi (DNMT), che trasferiscono un gruppo metilico dall'AdoMet alle citosine dei dinucleotidi CpG. Le DNMT 3A e 3B sono prevalentemente responsabili della metilazione *de novo*, mentre la DNMT1 riconosce il DNA demetilato e agisce prevalentemente come metiltrasferasi di mantenimento.

### ***SYBL1: UN ESEMPIO DI GENE REGOLATO DALLA METILAZIONE DEL DNA***

La presenza di un numero di cromosomi X differente tra il maschio e la femmina, insieme allo scarso contenuto in geni tipico del cromosoma Y, genera nei mammiferi uno squilibrio nel dosaggio genico che, se non corretto, può compromettere lo sviluppo embrionale e la vita adulta. La necessità di equilibrare i livelli di trascrizione dei geni *X-linked* ha quindi richiesto l'evoluzione di strategie di compensazione del dosaggio, che operano in tutti quegli organismi in cui la determinazione del sesso dipende dalla presenza di cromosomi dimorfici e bifunzionali. Nei mammiferi la compensazione del dosaggio è ottenuta assegnando ai due cromosomi X della femmina, per quanto identici e presenti nello stesso nucleo, due destini completamente diversi; in uno stadio molto precoce dello sviluppo, infatti, uno dei due cromosomi X, scelto a caso in ogni cellula, è reso completamente inattivo e trasformato in una struttura interamente eterocromatica, ben distinguibile citologicamente, definita “corpo di Barr”. Tale processo è noto come “inattivazione dell’X” o “lyonizzazione” (Lyon, 1998). Il coinvolgimento della metilazione del DNA nel mantenimento dello stato di repressione trascrizionale dei geni soggetti ad inattivazione è stato dimostrato per diversi geni. Lungo il cromosoma X inattivo della femmina, esistono gruppi di geni che sfuggono all'ondata di inattivazione; tali geni sono normalmente localizzati in regioni di omologia X/Y, distribuite lungo tutta la lunghezza dei cromosomi. Tra queste regioni di omologia ve ne sono due, caratterizzate da completa identità di sequenza, che rivestono un ruolo di fondamentale importanza nella meiosi maschile, in quanto è a livello di queste regioni che si verificano l'appaiamento e gli scambi genetici, eventi necessari affinché la segregazione degli omologhi nelle cellule figlie avvenga correttamente. Queste regioni, definite “pseudoautosomiche” (PAR\_ *Pseudo-Autosomic Region*) (Lahn *et al.*, 1994), sono localizzate alle estremità dei bracci corto e lungo dell’X e dell’Y. I geni pseudoautosomici mostrano un profilo di espressione biallelico, che ricorda quello dei geni autosomici. A questa regola generale fanno

tuttavia eccezione i due geni più telomerici della PAR localizzata all'estremità dei bracci lunghi dei cromosomi X e Y: SYBL1 e SPRY3. Tali geni sono infatti repressi sull'Y e sull'X inattivo, benché, essendo presenti in copia identica su entrambi gli omologhi, non richiederebbero alcuna compensazione del dosaggio. In entrambi i sessi esiste dunque una copia del gene potenzialmente funzionale ma trascrizionalmente repressa (D'Esposito *et al.*, 1996 ; Ciccodicola *et al.*, 2000). L'espressione genica di SYBL1, il più telomerico dei due, è particolarmente sensibile alla repressione trascrizionale indotta dalla metilazione; pertanto il profilo di espressione di SYBL1 può essere considerato un indicatore indiretto di ipometilazione genomica, che può essere causata, ad esempio, da un potenziale di transmetilazione non permissivo.

### ***PSORIASI E METILAZIONE DEL DNA***

Esistono nell'uomo patologie, con diversa eziologia, alle cui manifestazioni cliniche e fenotipiche si accompagna la metilazione difettiva di specifiche regioni del genoma. Una significativa ipometilazione è stata dimostrata, ad esempio, in pazienti uremici iperomocisteinemici (Ingrosso *et al.*, 2003) e in diverse malattie genetiche, tra cui l'ICF (Immunodeficienza, instabilità Centromerica e anomalie Facciali), causata da mutazioni nel gene *dmnt3b*. Anche nella psoriasi, così come in altre patologie dermatologiche a carattere infiammatorio, è stato suggerito l'instaurarsi di un livello difettivo di metilazione genomica, sebbene le evidenze in questo senso non siano ancora definitive (Young-In *et al.*, 1996). Di conseguenza, geni la cui espressione è strettamente dipendente dalla metilazione del relativo promotore potrebbero mostrare, in questi pazienti, un profilo di metilazione alterato. Un tale fenomeno è stato descritto in pazienti psoriasici, per il gene SHP-1, che codifica una proteina con attività protein-fosfatase ad espressione tessuto-specifica. L'espressione di tale gene può essere regolata, infatti, a partire da due diversi promotori. In particolare, il promotore 2 dirige

l'espressione del gene nelle cellule ematopoietiche ed è invece metilato nel tessuto epiteliale, che non esprime questa isoforma di SHP-1. In campioni biotici di cute psoriasica il promotore 2 di SHP-1 risulta demetilato, con la conseguente riattivazione del gene nel tessuto epiteliale (Ruchusatsawat *et al.*, 2005).



## **II LINEA SPERIMENTALE**

### ***DEREGOLAZIONE DEL PROCESSO APOPTOTICO NELLA PSORIASI:***

#### ***RUOLO DI BCL-XL***

#### **APOPTOSI**

L'apoptosi è un processo di morte cellulare programmata, potenzialmente presente in tutte le cellule, codificato a livello del loro genoma, che determina l'eliminazione controllata di alcune cellule per salvaguardare la sopravvivenza dell'organismo nel suo complesso. L'innesco del processo apoptotico può essere mediato da numerosi stimoli, e può avvenire secondo meccanismi diversi, a seconda del tipo di cellula coinvolta, che sembrano comunque convergere verso una sequenza di eventi altamente conservata. In particolare, la fase di innesco è seguita da una fase esecutrice in cui la cellula va incontro a diversi cambiamenti biochimici che culminano con l'attivazione di enzimi catabolici (proteasi e nucleasi) che tagliano proteine e DNA. In una morte cellulare per apoptosi si devono riscontrare condensazione nucleare, frammentazione del nucleo, taglio del DNA in frammenti internucleosomali (questi frammenti appaiono come i pioli di una scala nell'elettroforesi su gel di agarosio e l'aspetto viene pertanto definito "DNA ladder") e formazione di corpi apoptotici, senza rottura della membrana plasmatica. Un ruolo fondamentale è giocato dalle caspasi (cistein-proteasi). Infatti, dopo attivazione delle caspasi iniziatrici, si attivano, con un segnale a cascata, le caspasi esecutrici che tagliano proteine critiche per la sopravvivenza cellulare inducendo così la morte della cellula.

L'apoptosi può essere considerata un processo di morte cellulare "pulito" con danno minimo delle cellule e dei tessuti circostanti; questa caratteristica la distingue in modo netto dalla

necrosi *in vivo* poichè la completa eliminazione delle cellule apoptotiche non provoca risposta infiammatoria (Cohen JJ., 1993).

L'apoptosi è implicata in numerosi processi fisiologici e patologici riguardanti sia lo sviluppo embrionale che molti tessuti nella vita adulta. Durante la vita fetale l'apoptosi, che in questo caso viene chiamata morte cellulare programmata (PCD), gioca un ruolo molto importante nella involuzione di tessuti e nella eliminazione di cellule in eccesso per plasmare gli organi in modo definitivo (Bursch W *et al.* 1992). Nei tessuti adulti l'apoptosi è un processo cruciale nella omeostasi tissutale. L'apoptosi è infatti in grado di controbilanciare la mitosi indotta da fattori di crescita o da ormoni trofici (Raff MC., 1992). L'apoptosi funge da meccanismo di difesa per evitare l'accumulo di cellule con alterazioni geniche ed è implicata nella regressione tumorale; è stato visto che le cellule derivate da alcuni tumori hanno infatti una maggiore resistenza all'induzione dell'apoptosi (Kerr JFR *et al.*, 1994). La stessa cosa avviene anche in molte infezioni virali, dove le cellule infettate vanno incontro ad apoptosi per prevenire la propagazione del virus (White E., 1997). L'eccesso di apoptosi, comunque, può anche essere coinvolto in certe patologie. Molte malattie neurodegenerative, per esempio, (come la malattia di Alzheimer, la sclerosi laterale amiotrofica e la retinite pigmentosa) sono caratterizzate da una graduale perdita per apoptosi di specifici gruppi di neuroni. È stato recentemente dimostrato che, alcune sindromi mielodisplastiche sono caratterizzate da alterata produzione di cellule ematiche, a causa di un elevato grado di apoptosi dei precursori ematopoietici nell'ambito del midollo, che normalmente è inibita dalla presenza dei fattori di crescita. In termini molto generali, si potrebbe dire che troppa apoptosi può portare ad alterazioni dello sviluppo e a malattie degenerative, mentre scarsa apoptosi può essere alla base del cancro e di persistenti infezioni virali.

## ***APOPTOSI E CUTE***

L'apoptosi svolge un ruolo di estrema importanza nello sviluppo dell'epidermide e nelle patologie a carico di questo tessuto. La morte cellulare è, infatti, fondamentale nel mantenimento della struttura dell'epidermide, e alterazioni del delicato equilibrio tra proliferazione e morte cellulare possono essere alla base di severe patologie dermatologiche, quali il cancro e le malattie da iperproliferazione (Reefman *et al.*, 2005).

Il moderno concetto di apoptosi con gli aspetti biochimici e funzionali, molto studiato in altri organi e tessuti, non è stato quasi per nulla considerato, o certamente sottostimato in ambito dermatologico. Se si parla di possibili funzioni dell'apoptosi nella cute si deve cominciare dallo sviluppo embrionario. Haake e Polakowska hanno il merito di aver iniziato gli studi sull'apoptosi durante l'embriogenesi cutanea. In particolare le due ricercatrici americane hanno localizzato nella cute alcuni markers del "pathway" della apoptosi, come le transglutaminasi, la proteina BCL2 ed i nuclei frammentati (DNA nicks) per mezzo della tecnica TUNEL. Questi studi hanno confermato che l'apoptosi è coinvolta nella distruzione di specifiche cellule (corneociti) in via di sviluppo e nel rimodellamento dei follicoli piliferi e delle ghiandole sudoripare eccrine. L'insieme di tali osservazioni indica che sia l' iniziazione che la prevenzione dell'apoptosi sono implicate nella morfogenesi e nel rimodellamento dell'epidermide e degli annessi cutanei (Polakowska RR. *et al.*, 1994).

Nell'adulto l'epidermide è un epitelio stratificato che si rinnova continuamente ed è organizzato in strati funzionalmente distinti. Il comparto proliferativo è composto da cheratinociti basali attaccati alla membrana che separa l'epidermide dal derma sottostante. La migrazione dei cheratinociti basali negli strati soprabasali, spinoso e granuloso, si associa con il differenziamento morfologico e biochimico. Le cellule cambiano e diventano alla fine corneociti morti dello strato corneo. Queste cellule morte, che hanno perso gli organelli ed il nucleo, fungono da barriera protettiva tra l'organismo e l'ambiente esterno e sono

continuamente rimpiazzate da cellule morte che vanno incontro ad un nuovo differenziamento terminale. L'epidermide mantiene la sua integrità strutturale e biochimica se la nascita e la morte delle cellule è bilanciata in modo ottimale. I meccanismi che controllano l'omeostasi epidermica non sono ben conosciuti, ma studi di Potten nel 1987 sulla cute del topo, e soprattutto di Budtz (1994) sulla cute del rospo, indicano che l'apoptosi svolge un ruolo molto importante nello stabilire l'architettura epidermica e mantenere un numero appropriato di cellule attraverso la distruzione dei cheratinociti basali prodotti in eccesso. Tali studi sono, poi, stati recentemente estesi anche alla cute umana, partendo dalla osservazione che il processo apoptotico descritto da Budtz nel rospo è del tutto simile a quello osservato da Grubauer *e coll.* nell'epidermide umana a livello ultrastrutturale. Inoltre, cellule apoptotiche sono state riscontrate recentemente nell'epidermide adulta umana. Se l'apoptosi gioca un ruolo chiave nell'epidermide sarà importante allora definire i fattori e/o agenti inibitori o attivatori di tale processo. Alcuni autori hanno proposto che certi fattori che controllano la proliferazione e il differenziamento dei cheratinociti possono anche essere coinvolti nell'iniziazione e progressione dell'apoptosi epidermica. Studi recenti confermano la validità di tale ipotesi. È stato dimostrato, infatti, che il Nerve Growth Factor (NGF), sintetizzato e secreto dai cheratinociti umani in coltura, è in grado di prevenire l'apoptosi spontanea nelle stesse cellule (Pincelli C *et al.*, 1997). Inoltre, è stato osservato che il NGF è in grado di proteggere i cheratinociti umani dall'apoptosi indotta dai raggi UV (Marconi A *et al.*, 1998). Questo dato suggerisce la possibilità che il NGF, bloccando l'apoptosi di cellule andate incontro a mutazioni da raggi UV, giochi un ruolo importante anche nella carcinogenesi cutanea. È evidente allora che, oltre alla proliferazione e differenziamento cellulare, anche la morte cellulare per apoptosi dovrebbe essere attentamente valutata negli studi di fisiopatologia dell'epidermide umana. In particolare, una migliore comprensione dei meccanismi che inducono una cellula a commettere suicidio avrebbe implicazioni ovvie nello

studio dell'eziologia dei disordini iperproliferativi, incluse le neoplasie. Infine, la spiccata selettività del processo apoptotico, senza effetti dannosi sulle cellule circostanti e il suo stretto controllo genetico, sono un chiaro invito all'utilizzo terapeutico di tale meccanismo. Pensiamo, per esempio, alla psoriasi e ad altre malattie iperproliferative, come le neoplasie maligne, dove un farmaco ideale, topico o sistemico, dovrebbe essere in grado di indurre apoptosi delle cellule in eccesso o cancerose senza danneggiare le altre cellule.

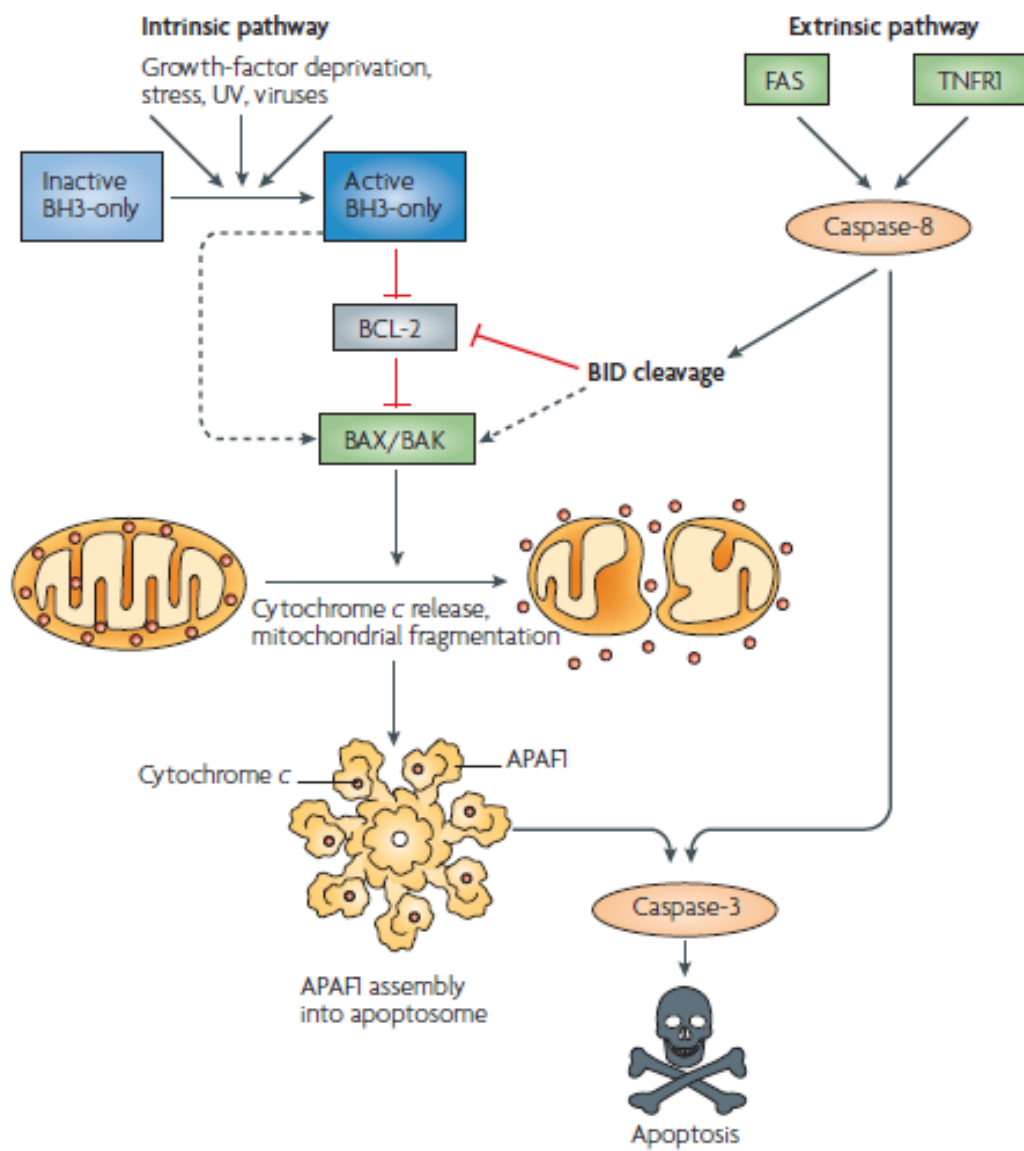
Diversi sono i *pathways* molecolari coinvolti nella promozione o, al contrario, nell'inibizione dell'apoptosi nei cheratinociti; molti di essi sono stati descritti in dettaglio grazie allo studio di linee cellulari immortalizzate (HaCat) (Ute Henseleit *et al.*, 1996). L'apoptosi nei cheratinociti è un processo fisiopatologico che può essere promossa sia da segnali estrinseci che da segnali intrinseci (Elmore S. 2007).

La via estrinseca è stimolata principalmente dall'esposizione ai raggi UVB, dal legame di FasL al suo recettore o dal TNF- $\alpha$ . Richiede l'intervento di recettori specifici, quali quelli appartenenti alla famiglia di FAS (che riconoscono FAS LIGANDO o FASL) e i TNF- $\alpha$  RECEPTOR (che legano TNF- $\alpha$ ). Quando questi recettori legano i rispettivi ligandi, i *domini di morte* (presenti nella parte intracitoplasmatica dei recettori) si attivano e legano proteine adattatrici (rispettivamente FADD e TRADD), che portano alla trasduzione del segnale. Si giunge dunque al clivaggio (taglio proteolitico) della PROCASPASI 8, la quale viene così portata alla sua forma attiva, CASPASI 8. Quest'ultima agisce sulla PROCASPASI 3.

La via intrinseca parte dall'interno della cellula e non richiede l'utilizzo di recettori. E' legata a modificazioni della membrana mitocondriale. Sulla membrana mitocondriale sono presenti le proteine della famiglia di BCL2 (B-Cell Lymphoma 2), le quali in situazioni normali sono bilanciate tra quelle a carattere proapoptotico (BAX, BAK, BID), e quelle con funzione antiapoptotica (BCL2, BCLXL). Queste proteine formano complessi omo- o eterodimerici e sono in grado di regolare la permeabilità della membrana mitocondriale, intervenendo

direttamente sulla fase di attivazione dell'apoptosi. Quando, a causa di un danno cellulare, avviene una sostituzione delle proteine antiapoptotiche (es. BCL2, BCLXL) con proteine proapoptotiche (es. BAC, BAX, BIM) reclutate dal citoplasma sulla membrana mitocondriale, avviene una modificazione del potenziale di membrana che permette il passaggio del citocromo c all'esterno. Il citocromo c si lega ad APAF-1. Il complesso citocromo c – APAF-1 agisce sulla PROCASPASI 9, che viene attivata in CASPASI 9. La CASPASI 9, poi, procede al taglio proteolitico della PROCASPASI 3.

Quindi le due vie apoptotiche si ricongiungono a livello di PROCASPASI 3: infatti sia la CASPASI 8 che la CASPASI 9 procedono al clivaggio di PROCASPASI 3. La CASPASI 3 attivata è in grado di tagliare il poli-ADP-ribosio-polimerasi (PARP), un enzima coinvolto nella riparazione del DNA (Fig.16).



**Figura 16.** Principali vie di trasmissione del segnale apoptotico, enzimi e molecole coinvolte..

## ***APOPTOSI E PSORIASI***

Evidenze accumulate negli ultimi anni sembrano indicare che nella psoriasi il processo apoptotico è difettivo. Molti dei meccanismi che regolano l'apoptosi nei cheratinociti normali sono aberranti nei cheratinociti psoriasici, rendendo queste cellule resistenti all'apoptosi. Coerentemente con l'osservazione che le placche psoriasiche sono resistenti all'apoptosi, molti dei farmaci utilizzati per trattare la psoriasi riducono l'iperplasia psoriasica inducendo l'apoptosi. Lo squilibrio tra proliferazione e morte cellulare contribuisce dunque all'ispessimento dell'epidermide e alla formazione della placca. Diversi gruppi hanno riportato che i cheratinociti nell'epidermide psoriasica hanno interruzioni nella doppia banda di DNA mostrando un profilo simile al DNA ladder; ciò potrebbe riflettere un processo apoptotico. Kwashima *et al.* recentemente hanno, però, dimostrato che l'aumento nel numero di interruzioni nella doppia banda di DNA nelle lesioni psoriasiche non è il risultato del processo apoptotico ma, piuttosto, è causato dall'attiva replicazione nel loro DNA. Insieme questi risultati mostrano che difetti nell'apoptosi possono giocare un ruolo importante nella patogenesi della psoriasi.

Il processo apoptotico nei cheratinociti è modulato dalle proteine BCL2 e sue omologhe come BAX e BCLXL (Tanja Batinac *et al.*, 2007, Richard J. Youle e Andreas Strasser 2008). Queste molecole interagiscono tra loro a formare omo- ed etero dimeri. Quando le molecole anti-apoptotiche, BCL2 o BCLXL interagiscono con BAX, BCL2/BAX o BCLXL/BAX, inibiscono l'effetto apoptotico di BAX.

Nell'epidermide, BCL2 è abbondante solo nei cheratinociti basali, essendo in tal modo un importante inibitore di apoptosi delle cellule basali (Moetaz El-Domyati *et al.*, 2006). Una diminuzione di espressione di BCL2 si osserva man mano che le cellule migrano verso l'alto, rendendo così le cellule soprabasali più sensibili all'apoptosi. È stato proposto che la diminuzione di espressione di BCL-2 può anche essere un segnale per le cellule epidermiche



di migrare verso l'alto. Nella cute psoriasica BCL2 mostra una ridotta espressione rispetto alla cute normale. Questi bassi livelli di espressione riscontrati nella psoriasi suggeriscono che BCL2 non contribuisce all'induzione del meccanismo apoptotico.

Risultati diversi sono stati riscontrati per BCLXL. Esistono almeno tre isoforme per la proteina BCL-X prodotte tramite splicing alternativo, chiamate BCL-XL, BCL-XS e BCL-X $\beta$ , dove mentre la prima ha un'attività inibitoria, le altre due forme promuovono l'apoptosi. Al contrario di BCL2, che si esprime con forza nel compartimento basale, ma è quasi del tutto assente negli strati soprabasali, BCL-XL risulta espressa prevalentemente negli strati spinoso e granuloso ed è quasi assente nelle cellule basali (Hidetoshi Takahashi *et al.*, 2002). Questo modello di espressione suggerisce che BCL-XL può essere responsabile della protezione dei cheratinociti da morte cellulare precoce prima del loro differenziamento terminale.

L'espressione di BCL-XL, che risulta essere moderatamente espressa nei cheratinociti umani normali, è altamente attivata nei cheratinociti iperproliferativi. Recentemente è stato dimostrato che la proteina BCL-XL risulta essere iperespressa in pazienti affetti da disordini mieloproliferativi e si ritiene che inibisca l'apoptosi (Rui Zhao M.D. *et al.*, 2008). Questa proteina, quindi, potrebbe contribuire alla longevità dei cheratinociti psoriasici andando a bloccare il normale processo apoptotico.

Come BCL-XL, BAX è molto espressa negli strati soprabasali mostrando una distribuzione opposta rispetto a BCL2. Nei pazienti affetti da psoriasi, invece, BAX mostra un'aumentata espressione nella psoriasi rispetto alla cute sana e a quella psoriasica non lesionale (Hidetoshi Takahashi *et al.*, 2002). In particolare, la diminuzione dell'apoptosi nelle placche psoriasiche è stata associata all'iperespressione di BCL-XL. Tale proteina risulta iperespressa in seguito ad una up-regolazione della trascrizione del gene relativo, che si traduce in un aumento della proteina rispetto a quanto si osserva nella cute sana. Questo eccesso di espressione potrebbe essere dovuto a segnali anomali di EGFR (epidermal growth factor receptor) (Stefan W. Stoll

*et al.*, 1998, Monika Jost *et al.*, 1999, Ulrich Rodeck *et al.*, 1997), all'aumento di espressione delle integrine e dei recettori delle integrine o ad un aumento di espressione dell' NF $\kappa$ B nelle placche psoriasiche. I cheratinociti psoriasici mostrano anche elevati livelli di NGF (Nerve growth factor) e del suo recettore ad alta affinità TrkA, che normalmente espresso solo nelle cellule basali, risulta espresso in tutti gli strati dell'epidermide psoriasica. Questo probabilmente contribuisce alla longevità delle cellule psoriasiche. In aggiunta, in biopsie di cute psoriasica è stato dimostrato un aumento nell'espressione di Fas, uno dei principali recettori di morte che attivano l'apoptosi per via estrinseca. Fas risulta marginalmente espressa nei cheratinociti basali normali. L'espressione di Fas è stimolata dall' IFN- $\gamma$  nei cheratinociti, ciò può spiegare l'aumento di Fas nell'epidermide psoriasica, che è caratterizzata da infiltrati di linfociti TH1. Secondo un recente lavoro, l'iperespressione di Fas nel tessuto affetto è antagonizzata dagli elevati livelli di BCL-XL, che promuove la sopravvivenza. In questa condizione il legame Fas/FasL non avrebbe l'effetto di scatenare la cascata apoptotica, ma piuttosto quello di attivare il TNF- $\alpha$  e l' IL-8 e innescare la risposta infiammatoria che si osserva in questa patologia (Gilhar A. *et al.*, 2006). Dai risultati di questi studi è possibile suggerire un ruolo cardine di BCL-XL nella patogenesi della psoriasi, contribuendo al meccanismo anti-apoptotico e all'ispessimento dell'epidermide psoriasica.

### ***APOPTOSI E ROS***

I ROS sono dei regolatori dell'apoptosi, in quanto essi inducono l'apertura dei pori sulla membrana mitocondriale con rilascio di fattori pro-apoptotici (Danial NN *et al.*, 2004) e, inoltre, inducono l'attivazione di varie cascate di segnali tra cui stimolazione della produzione di ceramidi, attivazione di JNK (Verheij M, *et al.* (1996), attivazione di p53 (Chipuk JE, *et al.* 2004, Moll UM, *et al.* 2005). Anche l'apoptosi indotta da TNF- $\alpha$  inizia con una produzione di ROS: questo tipo di risposta avviene principalmente nei linfociti T, nei monociti e nei

macrofagi in seguito al legame con specifici recettori di membrana (Larrick JW. and Wright SC. 1990). Le relazioni tra ossidanti e apoptosi sono spesso contraddittorie e complesse e non ancora ben definite. Infatti mentre la maggior parte dei dati indica che i ROS stimolano morte cellulare, altri dati suggeriscono che i ROS sono protettivi nei riguardi dell'apoptosi (Clement MV, and Stamenkovic I., 1996). I meccanismi che permettono alla cellula una decisione tra morte e vita sono finemente regolati e in molti casi lo stesso stimolo che induce apoptosi inizia anche un programma antiapoptotico (Johnstone RW. *et al.* 2002). I ROS, probabilmente, possono controllare sia l'apoptosi che la sopravvivenza cellulare attraverso una rete di comunicazione tra meccanismi apoptotici e sistemi di trasduzione del segnale che attivano la sopravvivenza cellulare, quali la proteina Serina/Tirosina chinasi PI3K/AKT (Datta SR, *et al.* 1999). Questo effetto di sopravvivenza, indotto dai ROS, sembra essere mediato da alcune proteine sensibili allo stato redox, tra cui NF-kB (Baldwin AS., 2001). Un'esposizione di ROS intracellulari può indirizzare verso l'apoptosi o la senescenza cellulare. Tuttavia alcune cellule possono sfuggire a tali controlli e la loro continua esposizione ai ROS può indurre mutazioni a carico del DNA con instabilità genomica che è alla base della trasformazione neoplastica (Storz P. 2005). E' di interesse notare che le cellule trasformate producono elevati livelli di ROS, in particolare di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Szatrowski TP, and Nathan CF. 1991). Tale esposizione ai ROS nelle cellule maligne può indurre svariate risposte che vanno da incremento della proliferazione cellulare, accumulo di danni ossidativi al DNA con mutazioni, ad aumento dell'espressione di geni antiossidanti e si può speculare che ciò comporta anche alterazioni nella resistenza di tali cellule ad agenti antitumorali (Johnstone RW, *et al.* 2002). Una spiegazione di come i ROS partecipano a processi così diversi è che il loro effetto dipende dalla quantità e dalla durata del "burst" ossidativo, anche se non è noto come la cellula opera un controllo sulla qualità e sulla quantità dei ROS. Certamente la produzione ed il livello dei ROS nella cellula è sotto stretto controllo in quanto una loro

eccessiva produzione comporta effetti citotossici. D'altra parte ROS specifici, a basse concentrazioni, possono comportarsi come secondi messaggeri. I fenotipi molecolari che caratterizzano la resistenza cellulare allo stress ossidativo sono associati ad espressione elevata di enzimi antiossidanti e di sistemi di riparo del DNA, così come ad attivazione di geni che inducono arresto del ciclo cellulare e riducono l'apoptosi.

Recenti studi hanno dimostrato che un microambiente ossidante può rendere le proteine più suscettibili alla deamidazione. Uno dei tratti distintivi della patologia psoriasica è l'instaurarsi di una condizione di stress ossidativo, determinata dall'attivazione di specifici linfociti a seguito del processo infiammatorio. Infatti, è riportato in letteratura che nella psoriasi si ha un aumento nella produzione dei ROS ed una riduzione delle difese antiossidanti cellulari.

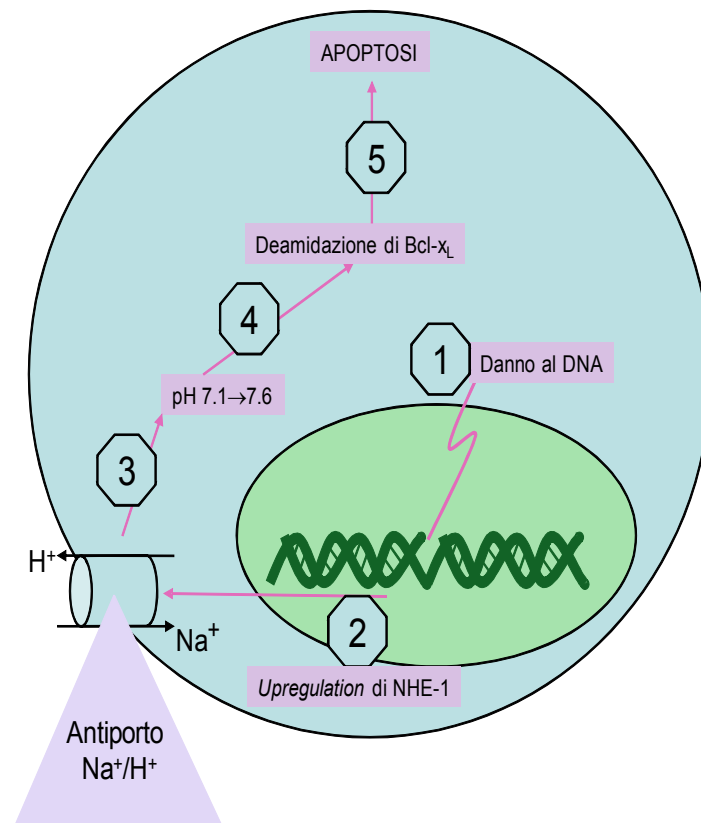
## **BCL-XL**

La proteina BCL-XL, membro della numerosa famiglia di proteine anti-apoptotiche BCL2, è un esempio di proteina substrato della deamidazione. La deamidazione di BCL-XL comporta una profonda modifica strutturale che compromette la funzione antiapoptotica di tale proteina. I primi a far luce su questo importante aspetto furono Aritomi *et al.* (Aritomi *et al.*, 1997), i quali hanno trovato che BCL-XL ricombinante di ratto esiste in due forme: la forma *nativa*, caratterizzata dalla presenza di residui di asparagina in posizioni critiche all'interno di una regione particolarmente flessibile, e la forma *deamidata*, nella quale le asparagine sono sostituite da residui aspartilici o isoaspartilici (Asn 52 e 66) (Figura 11). Queste due forme migrano separatamente su gel di poliacrilammide in SDS, come osservato anche mediante *western blotting* su proteine estratte da tessuti umani e di ratto (Sohma O. *et al.*, 1996; Mizuguchi M. *et al.*, 1996), suggerendo che la deamidazione di BCL-XL può avvenire anche *in vivo*. In seguito fu dimostrato che BCL-XL viene deamidata *in vivo* con formazione di isoaspartato, e che i livelli della forma nativa e di quella deamidata sono diversi nel carcinoma

epatocellulare (Takehara T. e Takahashi H., 2000). A queste due isoforme sono state attribuite capacità funzionali differenti. Mentre la forma nativa è in grado di proteggere le cellule dall'apoptosi in quanto non viene alterata l'attività anti-apoptotica di BCL-XL, quella deamidata potrebbe bloccare l'attività anti-apoptotica di BCL-XL e quindi favorire l'apoptosi. Deverman *et al.* (Deverman *et al.*, 2002) hanno dimostrato che la deamidazione di BCL-XL è determinante per gli effetti apoptotici degli agenti che danneggiano il DNA nelle cellule tumorali. In questo lavoro, il trattamento di cellule di osteosarcoma (SAOS-2), p53 ed Rb null con cisplatino (farmaco apoptotico) porta ad un cambiamento nel pattern di migrazione di BCL-XL simile a quello osservato da Aritomi *et al.* Si iniziò ad ipotizzare che la presenza della forma deamidata di BCL-XL poteva essere correlata con la morte cellulare. Essa potrebbe essere bloccata dall'induzione della proteina anti-apoptotica Rb in queste cellule. Questi autori hanno osservato che lo shift nella migrazione di BCL-XL è dovuto alla deamidazione delle asparagine 52 e 66, che rappresentano siti trovati all'interno della regione disordinata della proteina, come già osservato da Aritomi e collaboratori. La trasfezione di cellule SAOS-2 con costrutti esprimenti la proteina deamidata ne bloccano l'attività antiapoptotica. Inoltre, anche fibroblasti privi di p53, i quali conseguentemente non possono attivare la proteina Rb, sono vulnerabili al trattamento col cis-platino mediante la deamidazione di BCL-XL, come già osservato nelle cellule SAOS-2. Inoltre gli stessi autori hanno dimostrato che mentre l'isoforma nativa di BCL-XL era capace di legare e bloccare la proteina pro-apoptotica BIM, la forma deamidata impediva questa interazione.

La deamidazione di BCL-XL è un componente importante del pathway di trasduzione del segnale che regola la risposta cellulare al danno del DNA. Infatti, recentemente è stato dimostrato che un danno del DNA comporta l'iperespressione del trasportatore NHE-1 (carrier dell'antiporto  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) che a sua volta produce un aumento del pH intracellulare che, conseguentemente, facilita la deamidazione di BCL-XL, scatenando l'inizio della cascata

apoptotica (Zhao e Oxley, 2007). Infatti, in cellule umane di leucemia linfoide cronica (LLC) è stato dimostrato che un incremento forzato del pH induce deamidazione ed apoptosi (Fig.17).



**Figura 17. Meccanismo di deamidazione proteica.**

Questa proteina, inoltre, è coinvolta anche in alcuni tumori come la Leucemia Mieloide Cronica e la Policitemia Vera, che sono associate con l'attivazione di due diverse tirosina chinasi, rispettivamente la proteina chinasi di fusione BCR-ABL e la tirosina chinasi-2 Janus (JAK2) (Zhao *et coll.*, 2008). Normalmente queste tirosina chinasi funzionano come regolatori molecolari nella trasduzione del segnale cellulare. Se queste molecole risultassero,

per mutazione o fusione, sempre attive, perderebbero la loro funzione autoinibitoria e acquisterebbero la capacità oncogenica. In questo modo, risulterebbero essere altamente resistenti a trattamenti con agenti antitumorali. Sebbene ci sono diversi meccanismi che inducono questa resistenza, diverse ricerche dimostrano che le tirosina chinasi sono in grado di aumentare l'espressione di BCL-XL e, questo aumento di espressione è importante per la resistenza al trattamento farmacologico. Da questi studi è emerso che quando le tirosina chinasi hanno un'attività basale, BCL-XL viene espressa in condizioni fisiologiche ed è suscettibile alla deamidazione. Ciò rende le cellule sensibili all'apoptosi indotta da agenti chemioterapici. Quando l'attività di queste tirosina chinasi aumenta, senza, però, oltrepassare i livelli oncogenici, aumenta l'espressione di BCL-XL. In questo caso le cellule mostrano solo una sottile resistenza all'apoptosi. Se invece i livelli delle tirosina chinasi superano la soglia di oncogenicità, l'espressione di BCL-XL aumenta, ma il meccanismo di deamidazione è inibito e di conseguenza la cellula risulta essere altamente resistente agli stimoli apoptotici.

## **PCMT**

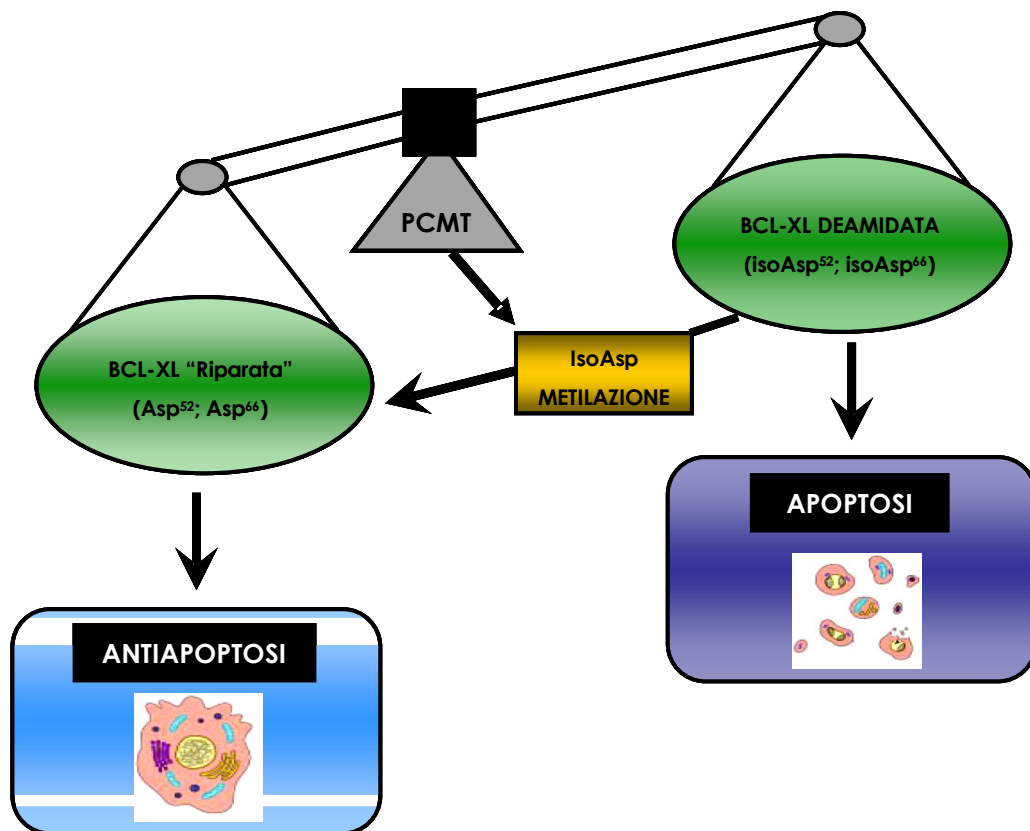
L'enzima PCMT, come già discusso ampiamente nella prima linea sperimentale, è in grado di riparare i danni molecolari, derivati dalla deamidazione delle proteine, attraverso la conversione dei residui alterati di acido L-isoaspartico in residui di acido L-aspartico. Dati preliminari di letteratura hanno dimostrato una correlazione inversa tra metilazione PCMT-dipendente e l'apoptosi (Huebscher K.J., *et al.*, 1999); in particolare l'iperespressione di tale enzima in cellule in coltura, sarebbe in grado di prevenire la morte cellulare programmata. Nessun meccanismo o bersaglio molecolare è stato definito alla base di tale attività antiapoptotica della PCMT.

Evidenze in questa direzione sono state recentemente ottenute dal nostro gruppo di ricerca e pubblicate sulla rivista *PloS One* (Cimmino *et al.*, 2008). In questo articolo è stato dimostrato

che cellule endoteliali che over-esprimono l'enzima PIMT sono più resistenti all'apoptosi indotta con  $H_2O_2$  rispetto a cellule in cui l'espressione della PIMT è stata bloccata tramite la trasfezione di un antisense o in cellule che esprimono dominanti negativi della PIMT in cui l'attività metiltrasferasica risulta abolita. L'analisi proteomica delle specie deamidate e aventi un ruolo nel processo apoptotico ha individuato una serie di proteine, tra cui BCL-XL. La riparazione dei legami isopeptidici, mediata dalla reazione di metilazione catalizzata dalla PIMT, è dunque in grado di ripristinare l'effetto protettivo di questa proteina nei confronti della morte cellulare programmata. La deamidazione può dunque essere considerata, in questo caso, non come una mera modificazione accidentale, frutto della senescenza cellulare o dello stress ossidativo, ma come un meccanismo che svolge una funzione di fine regolazione nei confronti del processo apoptotico.

L'enzima PCMT sembra sia coinvolto nella modulazione del processo apoptotico, ossia nel regolare il corretto bilanciamento, all'interno della cellula, tra la forma che contiene residui isoaspartilici e quella riparata di BCL-XL; inoltre questa proteina sfruttando questo sistema di riparo, è in grado di mantenere completamente funzionante la sua attività antiapoptotica. Queste osservazioni potrebbero implicare che l'alterata espressione di BCL-XL nell'epidermide psoriasica potrebbe essere secondario al processo infiammatorio nel derma. Inoltre la capacità della PCMT di riconoscere e metilare BCL-XL, in modo da prevenire le caratteristiche antiapoptotiche di questa proteina potrebbe suggerire un ruolo di questa metiltransferasi come potenziale bersaglio nella cura per la psoriasi e come bersaglio potenziale per farmaci antitumorali (Fig.18).





**Figura 18. Ruolo della Deamidazione-Metilazione di Bcl-XL nell'apoptosi.** BCL-XL, membro della numerosa famiglia di proteine anti-apoptotiche BCL-2, è un esempio di proteina substrato della deamidazione. Sono state identificate due isoforme in cui essa può esistere *in vivo*: una **nativa** ed una **deamidata** in cui due residui isoaspartilici Asn (52 e 66) si trovano all'interno di una regione particolarmente flessibile della proteina. Mentre la forma nativa è in grado di proteggere la cellula dall'apoptosi, quella deamidata perde la sua attività biologica, aumentando in tal modo la suscettibilità della cellula alla morte cellulare programmata.

### **III LINEA SPERIMENTALE**

#### ***EFFETTO DELLA TERAPIA BIOLOGICA SUI LIVELLI PLASMATICI DI MCP-1 IN PAZIENTI CON PSORIASI A PLACCHE.***

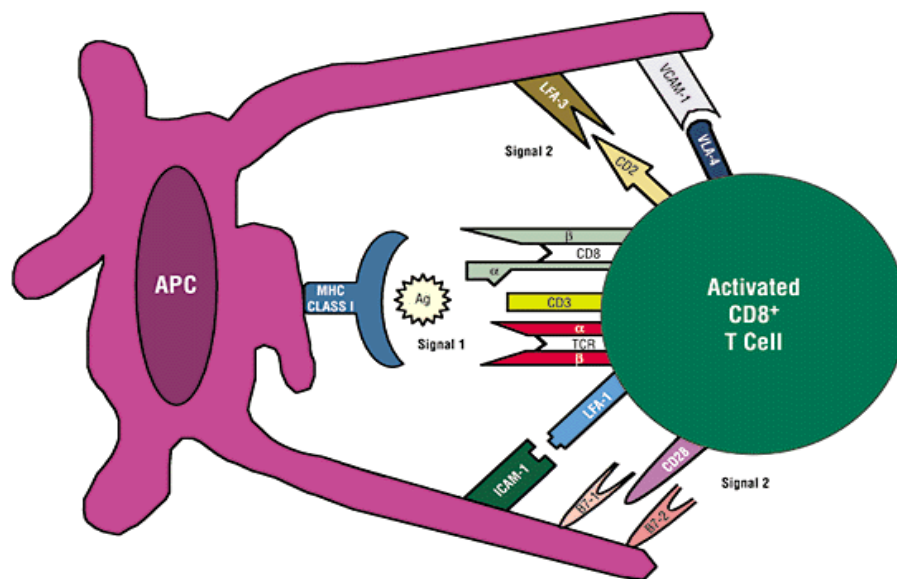
##### **LINFOCITA T E NETWORK CITOCHINICO**

Recenti acquisizioni suggeriscono che l'eccessiva proliferazione e differenziamento dei cheratinociti sia guidata dai linfociti T (Lebwohl M.; 2003). Il ruolo chiave dei linfociti T è stato dimostrato nel 1979 dall'efficacia di terapie immunosoppressive come la ciclosporina A e la tossina DAB389IL-2 e successivamente da evidenze di laboratorio. Queste comprendono:

1. la capacità da parte di agenti antipsoriasici di ridurre il numero di cellule T o APC o di entrambe;
2. l'efficacia clinica di terapie immunosoppressive come la ciclosporina A e FK506 la cui azione consiste nell'inibizione della produzione di citochine da parte del linfocita T CD4<sup>+</sup>;
3. gli anticorpi monoclonali anti-CD4 sono potenti agenti antipsoriasici;
4. cloni di cellule T derivanti da tessuto psoriasico promuovono *in vitro* la proliferazione dei cheratinociti.

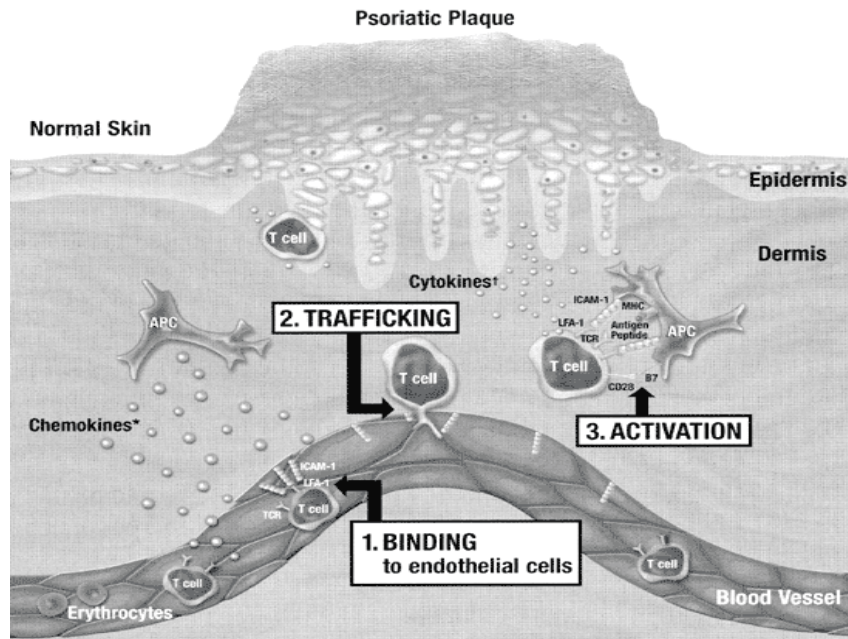
Le cellule T identificate nella placca psoriasica esprimono sulla loro superficie il CD45RO, un'isoforma a basso peso molecolare della tirosina fosfatasi, indice delle cellule memoria ed effettrici. Molti linfociti T esprimono, inoltre, il recettore dell'IL-2 (CD25) e HLA-DR, indici rispettivamente di attivazione precoce, media e ritardata. L'infiltrato di linfociti T precede la fase di proliferazione epidermica e di attivazione delle cellule endoteliali. Un antigene non ancora identificato attiva le cellule di Langerhans nell'epidermide. Tali cellule, note come cellule presentanti l'antigene (Antigen Presenting Cell, APC), una volta attivate, migrano ai

linfonodi regionali dove incontrano i linfociti T. Per l'attivazione dei linfociti T è necessaria la stimolazione del recettore delle cellule T (T Cell Receptor, *TCR*) da parte del complesso maggiore di istocompatibilità (Major Histocompatibility Complex-I o II, *MHC I* o *II*) espresso sulla superficie delle APC. Il contatto tra cellula T e APC richiede un secondo segnale costimolatorio e non antigene specifico, necessario, tuttavia, per completare l'attivazione. Il segnale costimolatorio è dato dall'interazione tra molecole espresse sul linfocita T e sull'APC: *CD2/Leukocyte Function Associated Antigen-3* (LFA-3), *Very Late Antigen 4* (VLA-4)/*Vascular Cell Adhesion Molecule* (VCAM-1), *LFA-1/Intercellular Adhesion Molecule* (ICAM-1), *CD40/CD40L.3* (Krueger JG.; 2002) Se il segnale costimolatorio è inibito la cellula T diventa “anergica” e non è più responsiva (Fig.19).



**Figura 19. Attivazione delle Cellule T.** L'attivazione delle cellule T richiede almeno due segnali presentati sulla superficie delle cellule APC. Il primo segnale si ha quando un antigene è presentato dal complesso maggiore di istocompatibilità al recettore presente sulle cellule T. Un secondo segnale, costimolatorio, si ha quando LFA-3 stimola CD2, B7 stimola CD28, o ICAM-1 stimola LFA-1, presenti sulla superficie delle cellule T.

I linfociti attivati esprimono specifiche proteine di superficie che gli conferiscono la capacità di migrare dai linfonodi, in cui sono attivati, ai vasi e ai tessuti extranodali come la cute. Il *trafficking* per raggiungere la cute richiede un rallentamento dei linfociti T durante la migrazione nel torrente ematico per interagire più facilmente con le molecole endoteliali. Questo processo è mediato dall'interazione tra la glicoproteina ligando-1, *CLA-PSGL-1* (Cutaneous Lymphocyte- Associated Antigen-P-selectina), espressa sui linfociti T attivati, e la *E-selectina* e la *Pselectina*, fortemente up-regolate sulle cellule endoteliali durante l'infiammazione cutanea. Le cellule T, in questo modo, possono rotolare lentamente ed effettuare legami di maggiore affinità con la superficie endoteliale (LFA-1/ICAM-1, VLA-4/VCAM-1); mediante un processo di diapedesi sono in grado di attraversare le pareti del vaso e seguendo il gradiente chemotattico migrano nel derma e quindi nell'epidermide (Fig.20) (Chin YH. *et al.*, 1989).

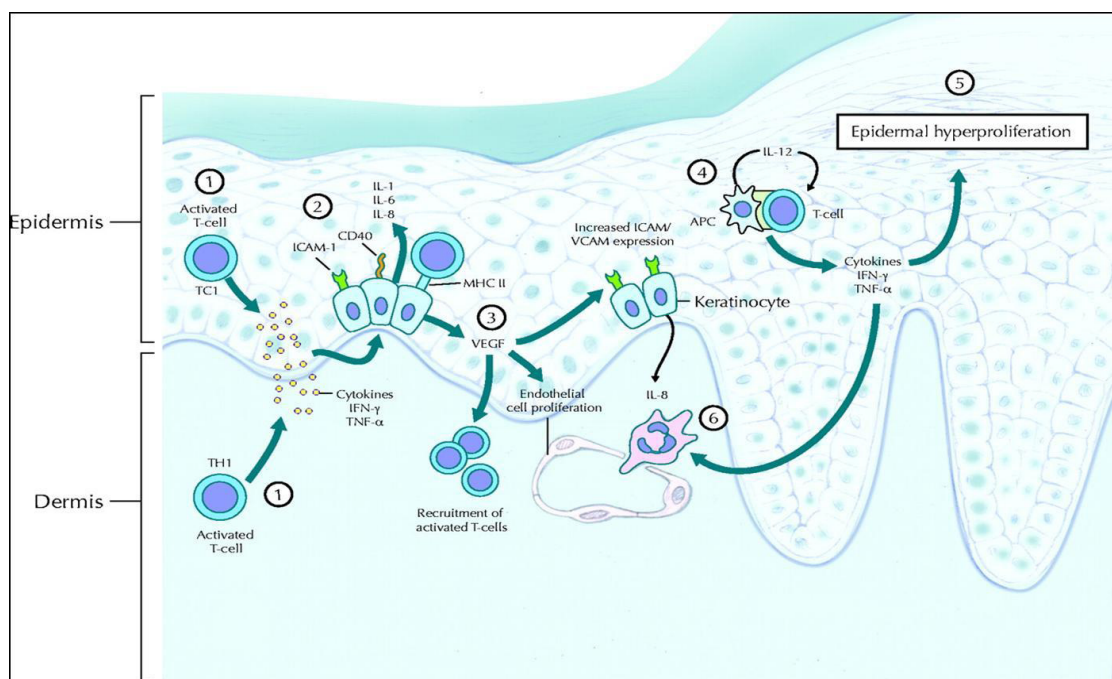


**Figura 20. Rappresentazione schematica che illustra alcune delle caratteristiche principali del meccanismo patogenetico della psoriasi.** Dopo l'attivazione delle cellule T, che provoca la loro maturazione e proliferazione, la cellula T matura esprime sulla sua superficie l'antigene CLA. L'antigene CLA è in grado di legarsi a E- e P-selectine espresse sulla superficie delle cellule endoteliali nel derma. (1) Questa interazione stimola le cellule T ad esprimere LFA-1 e VLA-4 e le cellule endoteliali a produrre molecole di adesione intercellulare e vascolare (ICAM e VCAM). L'interazione di queste molecole permette alle cellule T di migrare attraverso il derma. (2) Le cellule T possono quindi migrare verso le aree di espressione dell'antigene nel derma e nell'epidermide. (3) L'attivazione delle cellule T comporta la secrezione di citochine come IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e recluta altre cellule immunitarie tra cui i neutrofili. Le chemochine\* attraggono le cellule T nella pelle, le citochine<sup>+</sup> esercitano effetti infiammatori.

Le chemochine responsabili della migrazione delle cellule T sono prodotte dalle cellule endoteliali, dai cheratinociti, dai monociti e dalle cellule di Langerhans e il loro rilascio è stimolato dall'Interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e dal TNF- $\alpha$ .

Le cellule T attivate producono in generale uno o due tipi di citochine. Le cellule di tipo 1 (Th1) producono citochine pro-infiammatorie (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), mentre le cellule T di tipo 2 (Th2) producono citochine come IL-4, IL-5, IL-10. Le cellule T attivate (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) nelle lesioni psoriasiche producono principalmente citochine di tipo 1. Nella placca psoriasica le cellule CD4<sup>+</sup> sono maggiormente presenti nel derma mentre le cellule CD8<sup>+</sup>

nell'epidermide (Cabrijan L *et al.* 2009). Probabilmente esiste un'interazione tra queste due sottopopolazioni: le cellule  $CD4^+$  potrebbero essere responsabili degli eventi iniziali della patologia, mentre la popolazione dei  $CD8^+$  manterrebbe l'infiammazione cutanea. Il rilascio di citochine da parte dei linfociti T attivati stimola i cheratinociti e le cellule dendritiche a secernere a loro volta altre citochine. Questo determina la cascata infiammatoria tipica della psoriasi (Fig.21).



**Figura 21. Il processo patogenetico della psoriasi.** La risposta immunitaria nella psoriasi inizia quando le APCs offrono un antigene ancora sconosciuto alle cellule T, con conseguente produzione di citochine e l'innesco della malattia. (1). Le cellule T, attivate, esprimono citochine infiammatorie,  $TNF-\alpha$  e  $IFN-\gamma$ , che possono (2) indurre i cheratinociti a produrre molecole di adesione come ICAM-1, molecole co-stimolatorie come CD40 e MHC II, facilitando ulteriormente le interazioni cellule T/cheratinociti. (3) Il  $TNF-\alpha$ , prodotto dai cheratinociti, induce la produzione del fattore di crescita vascolare delle cellule endoteliali (VEGF) che causa la proliferazione delle cellule endoteliali, l'aumento dell'espressione di ICAM e VCAM e la successiva proliferazione delle cellule T attivate. I cheratinociti producono anche altre citochine proinfiammatorie, quali IL-1 e IL-6 che sono coinvolti nella risposta rigenerativa. (4) La stimolazione antigenica tra APC e cellule T attivate può verificarsi nell'epidermide senza bisogno di ulteriore migrazione di APC nel linfonodo. L' $IFN-\gamma$  ed il  $TNF-\alpha$  vengono continuamente prodotte generando il fenotipo caratteristico dei cheratinociti psoriasici, che si manifesta come (5) iperproliferazione epidermica, perdita dello strato granulare e nuclei conservati nello strato corneo (paracheratosi). (6) Il  $TNF-\alpha$  dei cheratinociti induce anche la produzione di IL-8 che è chemiotattico per i neutrofili.

## **CITOCHINE**

Un'ulteriore conferma dell'importanza dei linfociti T nella psoriasi è data dal ruolo centrale che svolgono le citochine da essi rilasciate (Ghoreschi K. *et al.*, 2003). Le cellule Th1 e Tc1 rilasciano varie citochine, tra cui l'IFN- $\gamma$  e il TNF- $\alpha$  (Austim L.M. *et al.*, 1999), le quali esercitano un ruolo centrale nella patogenesi della psoriasi (Brian J. *et al.*, 2007).

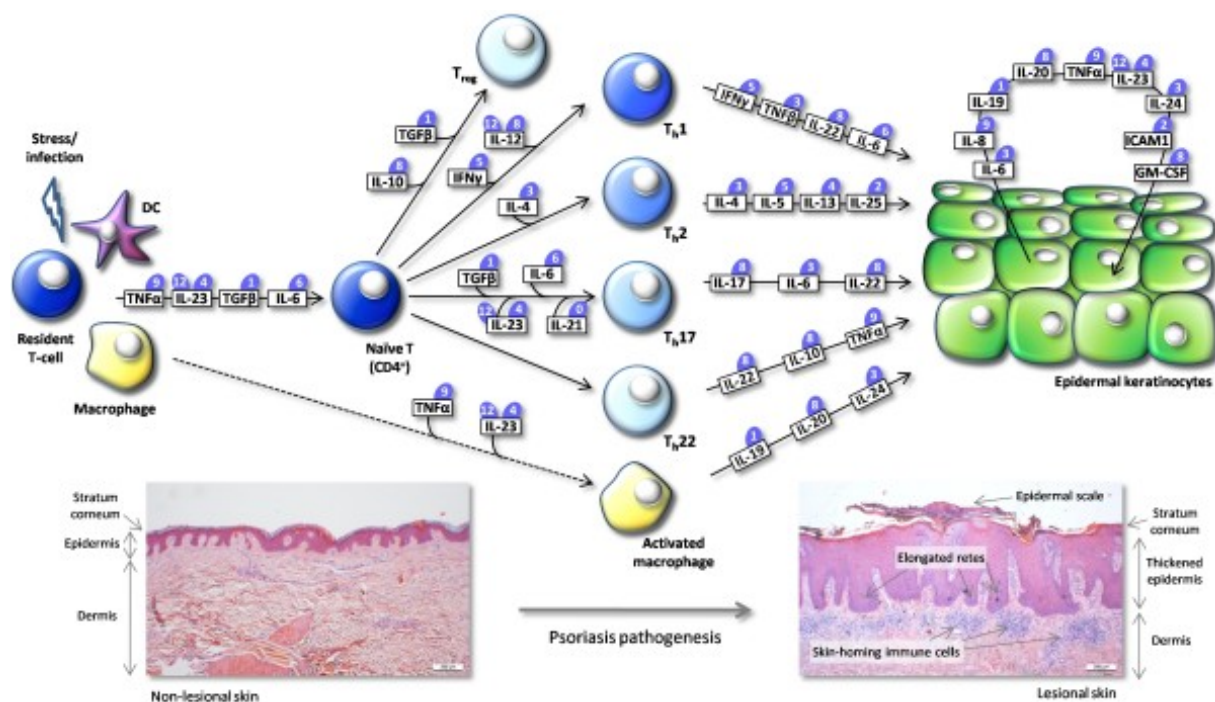
Il **TNF- $\alpha$**  è un'importante citochina pro-infiammatoria prodotto dalle cellule T attivate, dai cheratinociti e dalle cellule dendritiche. Il TNF- $\alpha$  è una citochina pleiotropica con diverse funzioni, tra cui quelle di mediare la proliferazione cellulare, l'infiammazione e l'apoptosi. Nella cute psoriasica è liberato da numerose popolazioni cellulari, svolgendo un ruolo patogenetico cruciale (Veale DJ *et al.*, 2005). Una iperespressione di TNF- $\alpha$  nella cute lesionale psoriasica induce il reclutamento di altre citochine pro-infiammatorie ed è, quindi, in parte responsabile dell'innescare sia della proliferazione cheratinocitaria che della persistenza della lesione psoriasica (Krueger J.G. 2002). Il TNF- $\alpha$  è coinvolto nella sopravvivenza cellulare attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- $\kappa$ B, cruciale nell'infiammazione. L'attivazione dell'NF- $\kappa$ B è mediata dalla fosforilazione di I $\kappa$ B che a sua volta comporta la dissociazione e la conseguente localizzazione nucleare dell'NF- $\kappa$ B attivato. Inoltre il TNF- $\alpha$  induce l'espressione, a livello della cute, di molecole di adesione intercellulare come ICAM-1 e VEGF (Gottlieb AB. *et al.*, 2005), aumenta l'espressione di IL-8 (appartente alla famiglia CXC delle chemochine) richiamando cellule T nell'epidermide. Il TNF- $\alpha$  è capace di modulare la produzione di altri mediatori flogogeni quali l'IL-1, l'IL-6, il GM-CSF.

È stato riscontrato un aumentato livello di **IFN- $\gamma$**  nel siero dei pazienti psoriasici. Se tale citochina viene iniettata in cute non lesionale di un paziente psoriasico può indurre iperplasia dell'epidermide. L'IFN- $\gamma$  up-regola le chemochine e le molecole di adesione permettendo un maggiore reclutamento dei linfociti nel sito infiammatorio. L'IFN- $\gamma$  prodotto dai linfociti T,

induce sui cheratinociti l'espressione di recettori capaci di amplificare la risposta immune. Inoltre questa citochina attiva i cheratinociti, stimolandone la proliferazione, e le cellule dendritiche che rilasciano IL-12 e IL-23. Recentemente, oltre alle sottopopolazioni di linfociti Th1, sono stati identificati dei linfociti T, che rilasciano IL-17 e IL-22 e quindi sono stati denominati Th17. IL-17 è una citochina chiave nelle malattie infiammatorie autoimmuni indotte in modelli animali (Komiyama Y *et al.*, 2006; Langrish CL *et al.*, 2005). Essa agisce sinergicamente con IFN- $\gamma$  aumentando il rilascio e la produzione di alcune citochine (IL-6, IL-8) da parte dei cheratinociti. Esperimenti *in vivo* mostrano che le cellule T diventano cellule Th17 in presenza di IL-6 e IL-23 (Langrish CL. *et al.*, 2005).

Altre citochine sono state recentemente descritte nella patogenesi della psoriasi (Lee E. *et al.*, 2004). IL-18 ha un effetto chemotattico sui monociti e sulle cellule dendritiche dell'epidermide inducendo la polimerizzazione dei filamenti di actina. Inoltre agisce sinergicamente con IL-12 nell'attivazione delle cellule T. L'espressione del recettore dell'IL-18 (IL-18R) è up-regolata dall' IFN- $\gamma$  e aumentati livelli plasmatici di IL-18 stimolano il rilascio di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule Th1 (Kanda N. *et al.*, 2007). IL-19 e IL-20 appartengono entrambe alla famiglia dell'IL-10. IL-19 viene prodotta da precursori cellulari (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF) e dai monociti; agisce principalmente sui cheratinociti attivando diversi fattori di trascrizione, stimola le cellule B e ha in generale un effetto pro-infiammatorio (Sabat R. *et al.* 2007). Krueger *et al.* hanno recentemente dimostrato un'aumentata espressione di IL-23 nelle lesioni psoriasiche di pazienti affetti da psoriasi volgare. IL-23 induce una risposta immune di tipo Th1 aumentando la produzione e la secrezione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule T di memoria e di IL-17 responsabile dell'attivazione di iNOS, un gene iperespresso nella psoriasi (Fig.22).





**Figura 22. Schematica rappresentazione del network citochinico nello sviluppo della psoriasi.** Le citochine mediano la comunicazione intercellulare tra le cellule immunitarie infiltrate nella pelle e i cheratinociti epidermici. Le cellule T e le cellule presentanti l'antigene (APC) si attivano dopo stimolazione da stress o infezione (indicato dal simbolo del fulmine), con conseguente produzione di citochine. Le cellule T Naïve ( $CD4^+$ ) subiscono il differenziamento in seguito all'esposizione a differenti citochine. Le citochine, quindi, guidano il differenziamento in una delle linee cellulari T-helper (Th1, Th2, Th17, Th22, o Treg). Un sottogruppo di citochine prodotto da ciascuno dei linfociti Th e dai macrofagi, stimolano i cheratinociti epidermici. Questo porta alla produzione di una serie aggiuntiva di citochine che innescano il rimodellamento epidermico, attraverso una alterata crescita e un anomalo differenziamento dei cheratinociti, e l'angiogenesi.

### ***MONOCITI E MACROFAGI NELLA PSORIASI***

I monociti sono una componente significativa nella psoriasi, così come in molte malattie infiammatorie croniche della cute. I monociti invadono la cute e si differenziano in macrofagi acquisendo in questo modo la capacità di migrare. L'esatto ruolo dei macrofagi nella patogenesi della psoriasi rimane ancora sconosciuto anche perché numerosi lavori scientifici hanno mostrato difficoltà nel distinguere le cellule dendritiche del derma dai classici macrofagi. Due recenti pubblicazioni dedicate alla psoriasi indotta nei topi suggeriscono che i

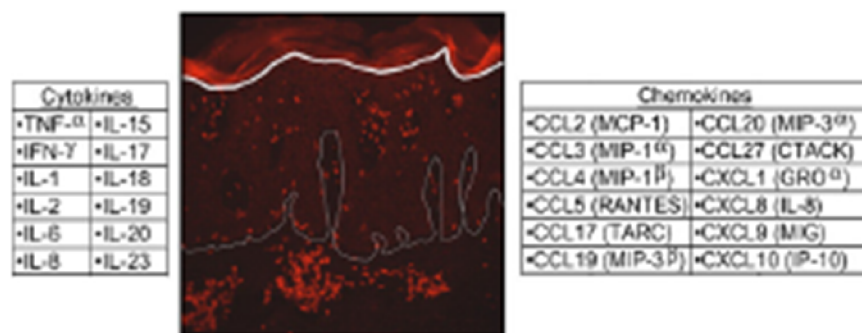
macrofagi sono indispensabili per generare i processi infiammatori legati alla psoriasi. Entrambi gli studi suggeriscono che i macrofagi sono le cellule che partecipano, in modo rilevante, al rilascio di TNF- $\alpha$ . Infatti se l'azione del TNF- $\alpha$  è bloccata, la cute psoriasica mostra miglioramenti e sia il numero di macrofagi infiltranti la cute sia i livelli di TNF- $\alpha$  si riducono, evidenziando che tale citochina è responsabile di un feedback positivo che è collegato con la manifestazione della psoriasi (Wang H. *et al.*, 2006, Stratis A. *et al.*, 2006). Inoltre è stato supposto che l'interazione cellule T-macrofagi sia la chiave della persistente infiammazione della patologia. Le cellule T e i macrofagi possono essere reciprocamente capaci di promuovere o attenuare il danno tissutale.

### **CHEMOCHINE**

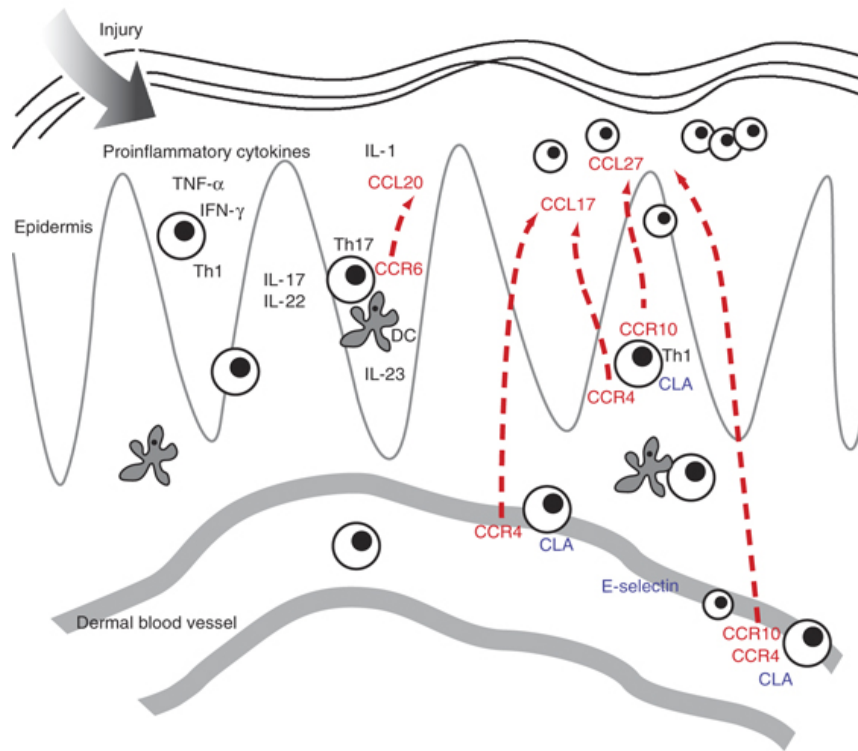
La migrazione T linfocitaria è controllata dal rilascio delle chemochine, mediatori sintetizzati da diversi stipiti cellulari che vengono attivati da citochine di origine linfocitaria aspecifica, quali IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Brian J. *et al.*, 2007). Le chemochine sono un gruppo di piccole proteine, strutturalmente correlate alle citochine, la cui principale funzione è quella di regolare l'attivazione e il reclutamento selettivo di monociti, neutrofili e linfociti. Una volta indotta, la migrazione delle cellule che esprimono i recettori per le chemochine avviene lungo un gradiente di legami chimici noto come gradiente chemochinico. Questo permette alle cellule di muoversi verso elevate concentrazioni locali di chemochine (Callewaere *et al.*, 2007). Sono divise in quattro gruppi in relazione alla posizione di due residui di cisteina nella sequenza aminoacidica: CC-, CXC-, CX<sub>3</sub>C- e C-chemochine (C indica il residuo di cisteina e X qualsiasi altro aminoacido) (Rottman JB. *et al.*, 2001). Il potenziale ruolo di queste molecole nella patogenesi della psoriasi è stato confermato dalla somministrazione di terapie basate sul blocco della migrazione e della residenza delle cellule T nella cute psoriasica (Lebwohl M. *et al.*, 2004). I recettori delle chemochine hanno 7 domini transmembrana e

sono classificati in CCR, CXCR, CX<sub>3</sub>C e CR in base al nome della chemochina che legano. I recettori possono legare diverse chemochine, ma sono maggiormente affini nei confronti di una sola famiglia (Pastore S., *et al.*; 2004). In particolare il recettore CCR2, che lega la proteina chemotattica per i monociti (MCP1 o CCL2) è espresso dai monociti circolanti e richiama monociti nei siti di infiammazione (Fig.23 e 24).

### **Citochine e Chemochine rilevate nelle placche psoriasiche caratterizzate da infiammazione cronica**



**Figura 23.** Caratteristica localizzazione delle cellule T (in rosso) coinvolte nell'epidermide e nel derma delle lesioni psoriasiche. Il pannello di sinistra mostra le citochine presenti nelle placche psoriasiche, mentre il pannello di destra mostra le chemochine e i ligandi presenti nelle placche psoriasiche.



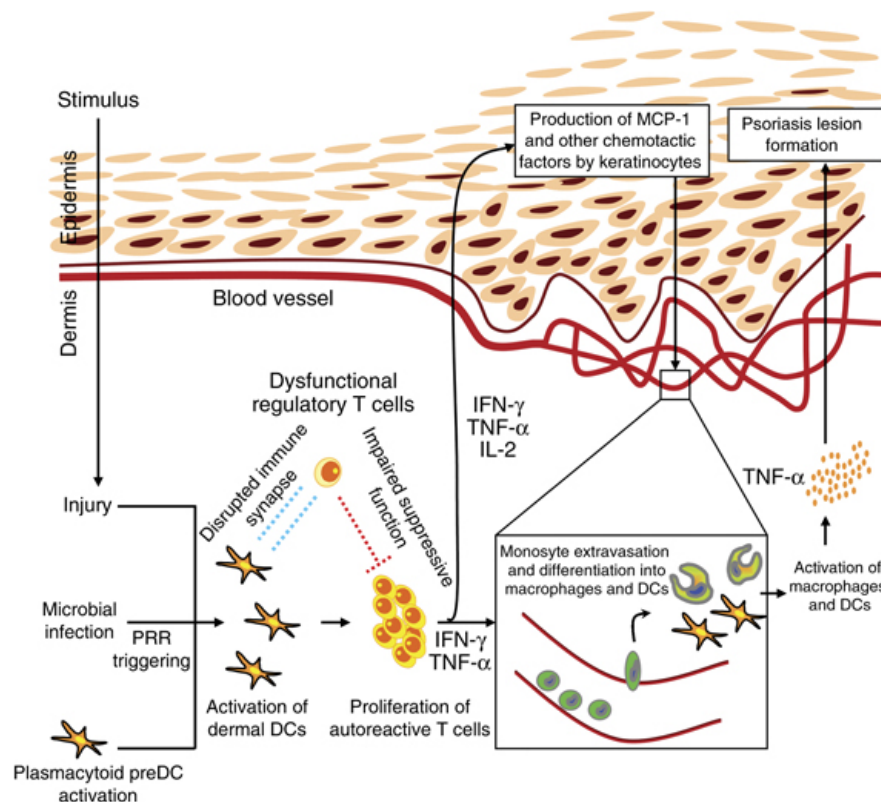
**Figura 24. Ruolo delle chemochine e loro recettori nella psoriasi.** Eventi comuni nelle lesioni psoriasiche sono l'attivazione delle cellule dendritiche e dei cheratinociti, il reclutamento e l'attivazione delle cellule T (prevalentemente di tipo Th1 e Th17), e danno dei cheratinociti. Mediatori infiammatori (TNF- $\alpha$ , IL-1, etc) stimolano la produzione di CCL27 da parte dei cheratinociti, nonché delle cellule endoteliali di derivazione CCL17, e può collaborare al reclutamento di ulteriori cellule T nel sito di infiammazione.

## MCP-1

La proteina Monociti Chemoattrattante Proteina 1 (**MCP-1**), nota anche come CCL2, è una delle principali chemochine di tipo-CC. Essa è secreta da diverse cellule nella pelle, compresi i cheratinociti, macrofagi e fibroblasti. È responsabile della migrazione e transmigrazione dei monociti e dei linfociti T attraverso l'endotelio durante l'infiammazione (Deshmane *et al.*, 2009). Come tale, aumenta in tutti i contesti infiammatori, inclusi aterosclerosi e fenomeni cardiovascolari. Esiste una chiara correlazione, ampiamente riportata in letteratura, tra psoriasi e insorgenza di malattie cardiovascolari. L'aterosclerosi è una patologia che ha un quadro clinico piuttosto complesso, in cui si ha l'aumento di marcatori trombotici in un substrato

infiammatorio. Anche l'associazione tra psoriasi e la frequenza del polimorfismo C677T della MTHFR è già stata descritta (Vasku V. *et al.*, 2009, Baiqiu *et al.*, 2000).

È riportato in letteratura che MCP1 aumenta nei pazienti psoriasici. La sua concentrazione plasmatica è amplificata dal TNF- $\alpha$ , che è il target principale della terapia immunitaria nella psoriasi con farmaci biologici. Anche CCR2, il ligando di MCP-1, mostra alti livelli di espressione nei monociti e nei macrofagi di pazienti psoriasici (Vestrengaard *et al.*, 2004). L'interazione tra MCP1 e CCR2 dovrebbe pertanto essere cruciale per il traffico dei monociti nelle lesioni cutanee della psoriasi. Di conseguenza MCP1 risulta essere una delle principali chemochine protagoniste del reclutamento linfocitario nella psoriasi (fig. 25). La funzione di MCP-1 e la sua concentrazione plasmatica sono stati indagate anche in altre malattie autoimmuni della pelle e i livelli plasmatici di MCP-1 sono stati trovati significativamente aumentati nel pemfigoide bolloso (Nakashina *et al.*, 2007) e nell'alopecia areata (Kuwano *et al.*, 2004), e correlate alla gravità della malattia. I livelli plasmatici di MCP1 possono essere considerati un indice valido dell'infiammazione tessuto specifica, e ci sono dati in letteratura che dimostrano come i livelli plasmatici di MCP1 diminuiscano dopo la somministrazione di farmaci anti-TNF- $\alpha$ . Inoltre, è riportato in letteratura che esiste un polimorfismo allelico a singolo nucleotide in posizione -1258 A/G nella regione di regolazione del gene che codifica per MCP1 che controlla differentemente i livelli della proteina MCP1. Solo individui che hanno genotipo omozigote GG mostrano una aumentata attivazione trascrizionale che comporta un aumento dei livelli di MCP-1 nel plasma. Il rapporto di questo polimorfismo con molte malattie infiammatorie è stato studiato. In particolare, un'associazione tra polimorfismo di MCP-1 e psoriasi è stata trovata nella popolazione cinese (Wang *et al.*, 2008).



**Figura 25.** La figura mette in evidenza come il TNF- $\alpha$ , rilasciato da diverse cellule nel derma, stimola la produzione di MCP-1 e di altre citochine chemotattiche da parte dei cheratinociti. Questi agenti chemotattici richiamano monociti dal circolo ematico, i quali maturano in macrofagi e cellule dendritiche. In questo modo essi mantengono ed amplificano la risposta infiammatoria e stimolano la proliferazione dei cheratinociti.

## TERAPIE BIOLOGICHE

Nelle varie teorie e nei modelli proposti per spiegare lo sviluppo della placca psoriasica sono stati valutati i singoli contributi di ogni tipo cellulare dell'epidermide e del derma, che partecipano all'infiammazione cutanea. Inizialmente l'attenzione dei ricercatori si è focalizzata sull'aspetto iperproliferativo dell'epidermide psoriasica e sullo studio di terapie volte al blocco della crescita incontrollata dei cheratinociti della placca. L'uso di agenti antiproliferativi come l'arsenico e, più tardi, il metotressato, fanno parte delle prime strategie terapeutiche contro l'iperplasia epidermica. In seguito, il successo della terapia a base di immunosoppressori come la ciclosporina A, ha spostato l'attenzione dalle cellule residenti

alle varie popolazioni di cellule del sistema immunitario reclutate nella cute, quali cellule dendritiche e sottotipi di linfociti T (Horn FJ *et al.*, 2007). In aggiunta a questa tradizionale terapia i pazienti affetti da psoriasi, che presentano un elevato indice di gravità della malattia, indicato dal *Psoriasis Area and Severity Index* (PASI), e che non hanno risposto alla terapia tradizionale, possono essere trattati con farmaci capaci di agire bloccando direttamente i recettori, le citochine e le cellule del sistema immunitario, che partecipano allo sviluppo della psoriasi. La terapia che utilizza questo tipo di farmaci è definita biologica (Lowes MA *et al.*, 2007). Tra i farmaci biologici in uso assumono particolare importanza i bloccanti del TNF- $\alpha$ . Questi farmaci anti-TNF- $\alpha$  sono usati nel trattamento di forme gravi di psoriasi, poichè inibiscono una citochina chiave nell'insorgenza di tale patologia. Attualmente, sono usati tre diversi inibitori di TNF- $\alpha$ : l'anticorpo monoclonale **Infliximab**, una chimera con catene costanti umane e catene variabili di topo; l'anticorpo monoclonale **Adalimumab**, interamente umanizzato e l'**Etanercept** una proteina di fusione tra una immunoglobulina umana e due recettori p75 del TNF- $\alpha$ . I due anticorpi monoclonali, infliximab e adalimumab, legano il TNF- $\alpha$  in forma solubile e quando il TNF- $\alpha$  è legato al suo recettore. In questo modo si forma un complesso che potrebbe modificare l'attività biologica delle cellule TNF- $\alpha^+$  o indurne l'apoptosi (Krüger-Krasagakis S, *et al.*, 2006). L'etanercept è una proteina che lega il TNF- $\alpha$  impedendone l'attività biologica ed è capace di indurre progressivi cambiamenti nel network delle citochine e delle chemochine delle lesioni psoriasiche, regolando le interazioni tra cellule T e DC residenti nella cute (Gottlieb AB *et al.*, 2005). La risposta alla terapia con i diversi farmaci bloccanti il TNF- $\alpha$ , certamente indica il ruolo chiave di questa citochina nella patogenesi della psoriasi (Lowes MA *et al.*, 2007). Questi farmaci hanno, pertanto, un'azione **immunosoppressiva** in quanto inibiscono l'azione del sistema immunitario.

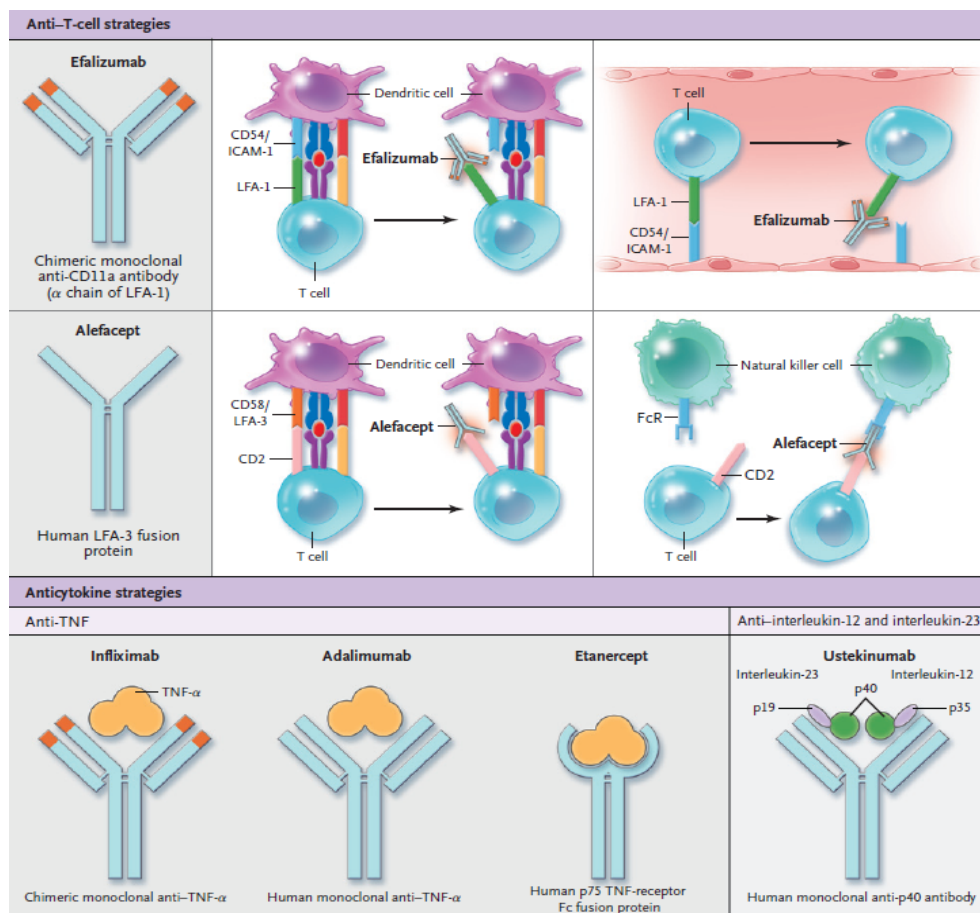
Un meccanismo di azione, diverso da quello spiegato dai farmaci anti-TNF $\alpha$ , è quello secondo il quale agisce un altro importante farmaco utilizzato nella cura di forme gravi di

psoriasi: **Efalizumab**. Si tratta di un anticorpo monoclonale umanizzato di classe IgG1 che lega, satura e riduce l'espressione del CD11 $\alpha$ , la subunità  $\alpha$  del leukocyte function antigen-1 (LFA-1), l'integrina predominante espressa sulla superficie delle cellule T. Agisce su più livelli del processo che genera la psoriasi:

1. impedisce l'attivazione dei linfociti T nei linfonodi da parte della cellula che presenta l'antigene;
2. impedisce l'adesione dei linfociti T attivati alle pareti dei vasi sanguigni della pelle e la loro successiva infiltrazione nel derma;
3. blocca la riattivazione dei linfociti T nel derma e nell'epidermide e, quindi, lo sviluppo dell'infiammazione che è alla base dell'iperproliferazione dei cheratinociti e dell'insorgenza della caratteristica lesione psoriasica.

Grazie a queste caratteristiche, possiamo considerare efalizumab un **immunomodulatore**, in quanto, pur agendo a più livelli del processo di insorgenza della psoriasi, non altera mai né blocca in maniera completa altre funzioni del nostro sistema immunitario (Fig.26).





**Figura 26. Meccanismi di azione e targets delle terapie biologiche della psoriasi.**

## SCOPO DELLA RICERCA

Da quanto esposto nella **prima linea sperimentale** si può dedurre quanto segue:

- La deamidazione di residui di Asn e la isomerizzazione/racemizzazione di residui di Asp, risultanti nella formazione di residui anomali di L-isoaspartato e D-aspartato, possono essere annoverati tra i danni più frequenti a carico delle proteine.
- Tali alterazioni aumentano con modalità tempo-dipendente e possono essere indotte anche da differenti tipi di *stress* come, ad esempio, uno *stress* di tipo ossidativo.
- La cellula dispone di sistemi enzimatici preposti alla riparazione di tali danni, la cui azione ne evita l'accumulo e le deleterie conseguenze sulla struttura e la funzione delle proteine.
- Alterazioni nel rapporto [AdoMet]/[AdoHcy] possono essere alla base dell'inibizione delle metiltrasferasi più sensibili, prima fra tutte la PIMT, che usa l'AdoMet come donatore di metili. Un corretto equilibrio del *pathway* metabolico che conduce alla sintesi di questo nucleoside solforato appare, pertanto, indispensabile per garantire un efficiente processo di riparazione delle proteine danneggiate mediato dalla metil esterificazione enzimatica.
- Numerosi dati di letteratura attribuiscono alla deamidazione proteica un ruolo fisiopatologico di notevole importanza, suggerendo tale alterazione biochimica come uno dei meccanismi principalmente responsabili della progressione di svariate patologie umane.

Pertanto, gli scopi del lavoro oggetto di questa tesi possono essere così riassunti:

1. Valutare l'eventuale accumulo di proteine danneggiate per la presenza di residui isoaspartilici in eritrociti di pazienti affetti da psoriasi a placche a confronto con soggetti sani di controllo;

2. Esaminare il corretto funzionamento del macchinario biochimico alla base del processo di riparazione dei residui isoaspartilici analizzando il pathway metabolico degli aminoacidi solforati. L'efficienza di funzionamento dell'enzima PIMT è infatti influenzata dalla disponibilità di AdoMet e dalla concentrazione di AdoHcy; pertanto il potenziale di transmetilazione, dato dal rapporto  $[AdoMet]/[AdoHcy]$ , rappresenta dunque un indice della capacità delle cellule di trasferire gruppi metilici a molecole accettrici;
3. Analizzare una seconda reazione di metilazione, catalizzata da una diversa metiltrasferasi che, al pari della PIMT, è sensibile al rapporto  $[AdoMet]/[AdoHcy]$ : la DNMT. Una ipometilazione del DNA potrebbe infatti causare la riattivazione di geni la cui espressione è metilazione-dipendente, quali geni improntati o inattivati sul cromosoma X. Per tale motivo è stata analizzata l'espressione genica di SYBL1, un gene *marker* la cui regolazione è metilazione-dipendente e la cui trascrizione è normalmente repressa sui cromosomi X inattivo e Y.

Da quanto esposto nella **seconda linea sperimentale** si può dedurre quanto segue:

- Accanto alla disregolazione del sistema immunitario, componenti intrinseche ai cheratinociti sono probabilmente coinvolte nell'insorgenza e nello sviluppo della psoriasi.
- Evidenze accumulate negli ultimi anni sembrano indicare che nella psoriasi il processo apoptotico è difettivo. Lo squilibrio tra proliferazione e morte cellulare contribuisce dunque all'ispessimento dell'epidermide e alla formazione della placca.
- La diminuzione dell'apoptosi nelle placche psoriasiche è stata associata all'iperespressione della proteina antiapoptotica BCL-XL. Tale proteina risulta

iperespressa in seguito ad una up-regolazione della trascrizione del gene relativo, che si traduce in un aumento della proteina rispetto a quanto si osserva nella cute sana.

- BCL-XL è annoverata tra le proteine substrato della reazione di metilazione enzimatica operata dall'enzima PCMT. Pertanto BCL-XL può esistere in forma nativa, avente funzione antiapoptotica, e in forma deamidata, in cui perde la capacità di inibire il processo apoptotico.
- Un minore livello di deamidazione della proteina BCL-XL, potrebbe comportare un aumento delle molecole ad azione antiapoptotica, un meccanismo che si sommerebbe a quello geneticamente determinato nei cheratinociti della placca psoriasica.

Per rispondere a tale quesito generale sono state messe in atto adeguate strategie e metodiche sperimentali con le quali è stato possibile:

1. Investigare la deamidazione di BCL-XL nella psoriasi attraverso l'analisi dell'abbondanza relativa dell'isoforma nativa e dell'isoforma deamidata di BCL-XL, utilizzando come modelli sperimentali cheratinociti da cute lesionale e cute sana di pazienti con psoriasi e controlli.
2. confermare l'esistenza dell'isoforma deamidata della proteina BCL-XL purificata *in vitro*;
3. analizzare e caratterizzare, tramite spettrometria di massa, le due isoforme di BCL-XL.

Da quanto esposto nella **terza linea sperimentale** si può dedurre quanto segue:

- Fattori genetici e ambientali, insieme ad alterazioni immunoregolative, partecipano alla patogenesi della psoriasi: l'attivazione di meccanismi immuno-mediati con il coinvolgimento prevalente dei linfociti T helper 1 (Th1) è alimentata da una cascata di

chemochine e citochine che promuovono e mantengono lo stato infiammatorio ed iperproliferativo tipico delle lesioni psoriasiche.

- La proteina chemoattrattante-1 per i monociti (MCP-1), risulta essere una delle principali chemochine protagoniste del reclutamento linfocitario e la sua concentrazione plasmatica è aumentata dal TNF- $\alpha$ , il principale bersaglio dell'immunoterapia con farmaci biologici nei pazienti psoriasici.
- Il polimorfismo di un singolo nucleotide nella regione promotrice del gene di MCP-1 (A1258G) è associato ad un'aumentata espressione della stessa chemochina; tale correlazione è stata riportata in diverse patologie infiammatorie. E' stato anche riportato un aumento di MCP-1 nel plasma di pazienti affetti da psoriasi.
- La risposta al trattamento biologico è estremamente variabile da soggetto a soggetto e può essere valutata solo *aposteriori*, dal momento che non esistono attualmente profili diagnostici e/o protocolli di valutazione consolidati, in grado di predire la probabilità di risposta al trattamento biologico su base individuale.

Pertanto, gli scopi del lavoro oggetto di questa tesi possono essere così riassunti:

1. Valutare l'incremento dei livelli di MCP-1 nel plasma di pazienti affetti da psoriasi a placche;
2. Verificare se i livelli di tale proteina possono rappresentare un valido ed innovativo marker di efficacia della terapia biologia nel controllo del processo infiammatorio che caratterizza la malattia psoriasica.
3. Utilizzare il polimorfismo di MCP1 come fattore di predizione precoce dell'efficacia dei trattamenti biologici.

# MATERIALI E METODI

## SELEZIONE DEI PAZIENTI

I pazienti oggetto di questo studio sono stati reclutati nell'ambito di un'ampia casistica di individui con psoriasi medio-severa, giunti all'osservazione della Clinica Dermatologica dell'Università di Napoli "Federico II" diretta dal Prof. Fabio Ayala.

I pazienti sono stati reclutati secondo i seguenti criteri di inclusione:

1. maschi di età maggiore di 18 anni
2. affetti da psoriasi o artropatia psoriasica
3. anamnesi negativa per malignità
4. anamnesi negativa per allergie a farmaci
5. assenza di patologie infiammatorie in corso
6. psoriasi moderata o severa
7. intolleranza o inefficacia di altre terapie tradizionali
8. *wash out* di almeno 2 mesi da ogni farmaco sistemico usato per la cura della psoriasi
9. assenza di terapia topica ed astensione da applicazione di topici per i successivi 4 mesi
10. test intradermico per la tubercolina negativo
11. anamnesi negativa per tubercolosi polmonare o extrapolmonare
12. anamnesi negativa per infezioni serie ricorrenti
13. anamnesi negativa per *lupus* o altre patologie autoimmunitarie
14. ANA test e anticorpi anti DNA a doppia elica negativi
15. firma del consenso informato

Ad ogni paziente sono stati prelevati 12 mL di sangue intero in *vacutainer* contenenti acido etilendiamminotetracetico (EDTA) (1mg/mL di sangue) come anticoagulante. I campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti entro 15 minuti dal prelievo, ed il plasma è

stato conservato a -80°C. Successivamente, i linfociti sono stati separati dagli eritrociti tramite centrifugazione isopicnica su gradiente di Ficoll (15 minuti a 3000 rpm, Eppendorf 5810R) in assenza di freno. Gli eritrociti sedimentati sono stati lavati tre volte con una soluzione salina isotonica (NaCl 0,9%). I linfociti, dopo due lavaggi con tampone fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline*, PBS) sterile, sono stati risospesi in una soluzione di lisi per l'estrazione dell'RNA, costituita da fenolo e isotiocianato di guanidina (Trizol, Invitrogen) e conservati a -80°C.

## **DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI OMOCISTEINA PLASMATICA**

I valori plasmatici di Hcy sono stati determinati mediante dosaggio immunologico a fluorescenza con luce polarizzata (FPIA), effettuato adoperando l'apparecchiatura automatica AxSym system (Abbott). L'analisi immunoenzimatica si basa sulla conversione, fortemente specifica, dell'Hcy in AdoHcy in presenza dell'enzima AdoHcy-idrolasi. Per il riconoscimento specifico del precursore/prodotto dell'Hcy sono utilizzati anticorpi monoclonali anti-AdoHcy. Questa determinazione indiretta dell'Hcy risulta essere molto vantaggiosa, poiché anticorpi anti-Hcy potrebbero cross-reagire con aminoacidi simili, quali metionina o cisteina, la cui concentrazione plasmatica è rispettivamente di circa 3 e 25 volte superiore a quella dell'Hcy. La tecnica della reazione si basa su due principi:

- Il legame competitivo con le proteine.
- Fluorescenza della luce polarizzata.

L'analita (Hcy) ed il tracciante competono per lo stesso sito dell'anticorpo; il legame sarà proporzionale alla concentrazione dell'analita nel campione in esame. Il sistema ottico FPIA misura, poi, la variazione di luce polarizzata per determinare la concentrazione dei traccianti non legati, e quindi la concentrazione degli analiti nel campione (fluorescenza con luce

polarizzata). La variazione dell'intensità della fluorescenza misurata sarà inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita. Per entrambe gli aminoacidi (Hcy e Met), i risultati sono espressi come concentrazioni  $\mu\text{M}$ .

#### **METILESTERIFICAZIONE IN SITU DEI SUBSTRATI METIL-ACCETTORI IN MEMBRANE ERITROCITARIE**

250  $\mu\text{L}$  di globuli rossi (RBC) intatti sono stati risospesi in un uguale volume di tampone 1 mM (Tris/HCl 5, pH 7,4; NaCl 160mM;  $\text{MgCl}_2$  0,96 mM; glucosio 2,8 mM) e incubate per 1 h a  $37^\circ\text{C}$  in presenza di 0,93 nmoli di L-(metil- $^3\text{H}$ ) metionina e 10 $\mu\text{L}$  di metionina fredda 7,5 mM. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state emolizzate in ghiaccio aggiungendo 30 mL di una soluzione di  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5 mM a pH 8.0 contenente PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride) 25  $\mu\text{M}$ , e le membrane sono state isolate centrifugando a 15000 rpm per 10 minuti. Le membrane sedimentate sono state lavate ancora due volte con lo stesso buffer tamponato ad un pH via via più acido (pH 7.2 per il secondo lavaggio e pH 6.2 per il terzo). Questi due ultimi lavaggi con tampone a pH decrescente vengono effettuati per garantire la stabilità dei metilesteri che si sono eventualmente formati. Onde valutare l'efficacia della procedura di lavaggio, 500 $\mu\text{L}$  di surnatante sono stati riversati in fiale di scintillazione contenenti 6 mL di liquido di scintillazione, ed è stata misurata la radioattività residua. La radioattività associata alle proteine, cioè la quantità di metilesteri [ $^3\text{H}$ ] formati, è stata misurata solubilizzando 20 $\mu\text{L}$  di membrana in 250  $\mu\text{L}$  di acido acetico 10mM, contenente 2,5% di SDS mediante conteggio in scintillazione in fase liquida. La concentrazione proteica è stata determinata secondo il metodo di Bradford (1976) usando il reattivo "*Protein assay kit*" della Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). La retta di taratura è stata costruita utilizzando diluizioni scalari di una soluzione a concentrazione nota



(1,5 mg) della proteina standard albumina di siero bovina (BSA) (BIORAD). I risultati sono espressi come DPM/mg di proteina.

## **IDENTIFICAZIONE MEDIANTE ANALISI ELETTROFORETICA DEI SUBSTRATI METILESTERIFICATI IN SITU**

Le membrane metilesterificate in globuli rossi intatti sono state analizzate per elettroforesi verticale denaturante in SDS (SDS/PAGE), usando gel di 1,5 mm di spessore. Il gel separatore è stato preparato secondo la procedura di Fairbanks G. *et al.* (1971): poliacrilammide al 5,6%, SDS all'1% e pH 7,4. Per il gel impaccatore è stato seguito il protocollo di Laemmli U. K. (1970): poliacrilammide al 5,1%; Tris/HCl 1 M pH 6,8; SDS allo 0,1%. Sono state saggiate contemporaneamente membrane di RBC di un soggetto sano e membrane di un paziente con psoriasi a placche. Campioni contenenti 30 µg di proteina sono stati diluiti 4 volte con *buffer* riducente [1 mL di Tris 0,5 mM pH 6,8; 1,6 mL di SDS 10%; 400 µL di β-mercaptoetanolo; 4,0 mL di H<sub>2</sub>O; Blu di Bromofenolo 0,05 %] ed incubati a 37°C per 15 minuti. Tutti i campioni sono stati fatti migrare utilizzando un voltaggio di 40 V per lo *stacking* e 100 V per il *running*. Dopo la corsa, il gel è stato tagliato in due metà. Una parte è stata colorata con il *Coomassie Brilliant Blue* e successivamente analizzata con un densitometro a laser. La quantità delle principali proteine di membrana è stata espressa come valore dell'area superficiale delimitata dalla curva densitometrica. L'altra parte è stata tagliata in strisce di 2 mm e le proteine sono state eluite da ciascuna fettina del gel, in seguito a trattamento con 400 µL di acetato di sodio 50 mM, Triton X-100 0,25%, pH 5,2. Dopo incubazione di 18 h a temperatura ambiente sotto agitazione su un piano basculante, la radioattività, dovuta ai gruppi [<sup>3</sup>H]metilici che diffondono nella fase organica, è stata misurata in fiale contenenti 6 mL di liquido di scintillazione (Galletti *et al.* 1983). La radioattività

dovuta al rumore di fondo, ottenuta considerando la media delle 10 letture più basse, è stata sottratta a ciascun valore.

## **DOSAGGIO MEDIANTE HPLC DELLE CONCENTRAZIONI INTRAERITROCITARIE DI ADOMET ED ADOHCY**

A 800 µL RBC sono stati aggiunti 200 µL di acido perclorico (PCA) al 20%. I campioni sono stati centrifugati per 3' a 10000g. Un volume di surnatante pari a 400 µL è stato impiegato per l'analisi in cromatografia liquida ad alta pressione (*high performance liquid chromatography* HPLC). Il metodo cromatografico è stato condotto utilizzando uno strumento Agilent 1100 series munito di rivelatore UV settato alla lunghezza d'onda di 254 nm. L'intero sistema è sotto il controllo di un software ChemStation collegato ad un computer *hp* 7500. La colonna in fase inversa Zorbax C8 (25 cm\* 4 mm; Du Pont - New England Nuclear, Boston, MA) è stata equilibrata con tampone A [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM; acido eptansulfonico 10 mM; pH 3.2] contenente acetonitrile (ACN) al 4% ad un flusso di 1 mL/min. I nucleosidi sono stati eluiti utilizzando un flusso di 1 mL/min con un gradiente lineare 4-20% di ACN della durata di 15', seguito da un gradiente lineare 20-25% di ACN della durata di 10' e, per concludere, è stato impiegato un gradiente 25-40% di ACN della durata di 2'. L'eluente è stato mantenuto a questa percentuale di ACN per 5', e successivamente riportato in 5' al 4% di ACN. I tempi di ritenzione sono stati 12' per l'AdoHcy e 14' per l'AdoMet. La corsa cromatografica è stata eseguita in doppio, iniettando ciascuna volta 150µL del campione, i valori di AdoHcy e AdoMet per ciascun campione sono stati ottenuti per differenza con lo standard di riferimento, costituito da 100µL di campione a cui sono aggiunte 200pmoli di AdoMet e 200pmoli di AdoHcy.

## DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ SPECIFICA DELL'ENZIMA PIMT

Per la determinazione dell'attività specifica della PIMT, un'aliquota di RBC è stata prima sottoposta a lisi termica (15' a  $-80^{\circ}\text{C}$ ), e poi a lisi meccanica (2' sul vortex) (Beutler *et al.*, 1977). Il lisato cellulare così ottenuto, è stato centrifugato 15' a 14.000g ed è stato recuperato il surnatante costituito dal citosol. Il campione da impiegare per il saggio è stato preparato diluendo dieci volte 30  $\mu\text{L}$  di citosol con una soluzione stabilizzante di EDTA 2,7 mM, pH 7,0;  $\beta$ -mercaptoetanolo 0,7 mM. L'attività enzimatica è stata determinata *in vitro*, in presenza di ovalbumina e di S-Adenosil L-[ $^{14}\text{C}$ -metil-metionina] in concentrazioni saturanti, usando la strategia di diffusione di vapore di MacFarlane D.E. (1984). La miscela del saggio, diluita in tampone citrato 0,1M, pH 6.0 del volume finale di 40  $\mu\text{L}$ , contiene: 1,6mg di ovalbumina (substrato metil accettore; concentrazione finale 40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 2,8  $\mu\text{g}$  di proteine del citosol, ed S-Adenosil L-[ $^{14}\text{C}$ -metil-metionina] (come donatore di metili) ad una concentrazione finale di 33  $\mu\text{M}$ . Dopo 10' di incubazione a  $37^{\circ}\text{C}$ , la reazione è stata interrotta aggiungendo 40 $\mu\text{L}$  di NaOH 0,2 M e sodio dodecilsolfato (SDS) 1%: in questo modo i metil[ $^{14}\text{C}$ ]-esteri formati sull'ovalbumina vengono idrolizzati liberando [ $^{14}\text{C}$ ]metanolo. Il saggio viene proseguito come precedentemente descritto in accordo con il metodo di Murray E. & Clarke S. (1984). L'attività specifica della PIMT è espressa come unità di attività enzimatica (U) per mg di emoglobina (Hb) (U = picomoli di metil esteri formati per minuto). La concentrazione di Hb viene determinata spettrofotometricamente, misurando l'assorbimento della luce ultravioletta alla lunghezza d'onda di 280 nm, con  $A_{280}(\text{Hb}) = 2,4$  (Gilbert J.M. *et al.* 1988).

## GENOTIPIZZAZIONE DEI PAZIENTI

### *Reazione a Catena della Polimerasi (PCR) e digestione*

Il DNA genomico è stato estratto da sangue intero di maschi affetti da psoriasi a placche mediante il kit per l'estrazione degli acidi nucleici, *Wizard Genomic DNA purification Kit*

(Promega). La reazione di amplificazione è stata condotta utilizzando 50ng di DNA genomico di ciascun paziente per 35 cicli, ad una temperatura di appaiamento degli oligonucleotidi di 58°C. Il prodotto di amplificazione è un frammento di 189 bp nella regione promotrice di SYBL1. Le sequenze degli oligonucleotidi usati sono qui di seguito riportate:

SYB17 (senso) 5' – CCAAGAGGCCACGCGTAG-3 '

SYB26 (antisenso) 5' –GTTCTCTCCCCGCCTCCC-3'

I prodotti di PCR sono stati dunque digeriti con XhoI (10U) a 37°C per tutta la notte e successivamente caricati su gel di poliacrilammide al 12%, per verificare che i soggetti fossero eterozigoti per il polimorfismo che crea il sito di restrizione dell'enzima XhoI.

## **ANALISI DELL'ESPRESSIONE ALLELICA**

### ***RT-PCR***

L'RNA dei pazienti e dei controlli eterozigoti è stato estratto utilizzando il TRIZOL Reagent (Invitrogen). Il TRIZOL è una soluzione monofasica costituita da fenolo e guanidina isotiocianato, che permette di estrarre l'RNA e contemporaneamente di evitare l'insorgere dei possibili fenomeni di degradazione che potrebbero verificarsi durante la fase iniziale di omogeneizzazione del campione. L'aggiunta di cloroformio e la successiva centrifugazione a 10000 rpm per 15 minuti in condizioni refrigerate, induce la formazione di due fasi distinte: una fase organica ed una fase acquosa. Alla fase acquosa, contenente l'RNA, vengono aggiunti 500 µL di isopropanolo che permette all'RNA di precipitare, di essere recuperato e successivamente lavato con etanolo freddo al 75%. Tutte le soluzioni utilizzate per il protocollo di estrazione sono preparate con dietilpirocarbonato (DEPC). Per la sintesi del cDNA a partire dall'RNA estratto è stato utilizzato il kit Super Script (Invitrogen). Per l'analisi dell'espressione di SYBL1 il cDNA di ogni campione è stato amplificato con i seguenti oligonucleotidi:

Ex1RT (senso) 5'-TGGGAGCGGGCATTGGCGA-3'

Ex2RT (antisenso) 5' –TTGCCATGTGAGTTAGTTT-3'

Tali oligonucleotidi riconoscono rispettivamente l'esone 1 e l'esone 2 del gene, secondo una strategia di amplificazione non colineare che consente di evitare la contestuale amplificazione di DNA genomico contaminante. La reazione di amplificazione è stata condotta per 35 cicli ad una temperatura di 62°C, e genera un prodotto di amplificazione di 237 coppie di basi. Il prodotto ottenuto dalla RT-PCR è stato marcato con [<sup>32</sup>P]dCTP attraverso una strategia di Hot-Stop-PCR.

### ***HOT-STOP PCR***

Questa tecnica consiste in una reazione di amplificazione che prevede l'impiego di dCTP marcato con [<sup>32</sup>P] solo durante l'ultimo ciclo di amplificazione ed elimina la possibilità di falsi risultati generati dalla presenza di prodotti di amplificazione eteroduplex. La Hot-Stop PCR è caratterizzata da un numero di cicli sub-saturante (nel nostro caso 28), tale che nell'ultimo ciclo della reazione tutti i prodotti di amplificazione incorporino il nucleotide marcato. Il prodotto di amplificazione radiomercato, lungo 237 bp, è digerito con l'enzima XhoI a 37°C per tutta la notte. Questo enzima taglia l'allele con il sito di restrizione in due frammenti, rispettivamente di 190 e 47 bp, rivelati tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide al 12% ed autoradiografia.

## **DETERMINAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI DI MCP1 E GENOTIPIZZAZIONE**

Per la determinazione della concentrazione plasmatica di MCP1 e la genotipizzazione sono stati arruolati 30 pazienti (età media 48,4 anni) affetti da psoriasi a placche da moderata a severa e 10 controlli sani. Le caratteristiche demografiche ed anamnestiche sono state raccolte

attraverso un questionario. La gravità della psoriasi è stata valutata in base al *PASI* (12-13). Il *PASI* (*Psoriasis Area and Severity Index*) è un indice che definisce la gravità della malattia in relazione all'estensione dell'area coinvolta prima, durante e dopo il trattamento. Un *PASI*<10 indica che la psoriasi interessa meno del 10% della superficie corporea ed è ben controllata con la terapia locale, mentre un *PASI* >10 indica psoriasi moderata-grave che interessa più del 10% della superficie corporea con mancata risposta alla terapia locale.

I criteri di esclusione per il gruppo dei pazienti sono stati la presenza di:

- altre malattie infiammatorie della pelle,
- diabete,
- malattie epatiche,
- malattie renali
- malattie cardiovascolari.

I criteri di esclusione per il gruppo di controllo sono stati la presenza di:

- malattie infiammatorie di rilevanza clinica
- aumento dei livelli di marcatori infiammatori di uso comune, come ad esempio la CRP.

A tutti i soggetti è stato eseguito un prelievo di sangue venoso. I pazienti, al momento del prelievo erano in wash-out da terapia sistemica, tradizionale e/o biologica. I campioni di sangue, ottenuti da tutti i pazienti e controlli, sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA e per la raccolta del plasma. I livelli plasmatici di MCP-1 sono stati determinati mediante test ELISA (R&D Systems) secondo il protocollo del Produttore. La genotipizzazione dei pazienti per il polimorfismo -1258 A/G è stato analizzato come descritto da Hong *et al.*, 2006. Abbiamo, inoltre, selezionato 18 pazienti eleggibili per la terapia biologica. I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi: A) pazienti che avevano intrapreso terapia biologica anti TNF- $\alpha$  (adalimumab, etanercept, infliximab); B) pazienti che avevano intrapreso terapia biologica

anti CD-11 (efalizumab). Questi pazienti subivano un secondo prelievo di sangue, dopo 2 mesi dall'inizio del trattamento.

## **ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica dei risultati ottenuti è stata eseguita utilizzando il *t test - Student* per dati appaiati e non appaiati. Tutti i dati sono espressi come media  $\pm$  DS. Un test non parametrico (test Mann-Whitney) è stato utilizzato per analizzare le differenze nei livelli plasmatici MCP1 tra il gruppo dei pazienti e quello dei controlli.

## **COLTURE CELLULARI**

Le colture cellulari utilizzate in questo lavoro sono rappresentate dalle cellule HaCat, una linea cellulare di cheratinociti umani spontaneamente immortalizzati (in cui il fenotipo immortalizzato è ottenuto attraverso la mutazione di *p53* su entrambi gli alleli). Le cellule sono state coltivate in piastre da 10x15mm (10 mL) in mezzo di coltura Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Invitrogen Corporation CA, USA) addizionato con 10% di siero fetale bovino (FBS), 100 Unità/mL di penicillina/streptomicina e 2 mM di L-glutamina, e sono state cresciute a 37° C in un'atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5%. Le cellule, giunte alla confluenza, sono state staccate utilizzando 500  $\mu$ l di Tripsina 0,25% (SIGMA), raccolte mediante centrifugazione (2000 rpm per 5 minuti) e lavate con 10 mL di PBS 1X. Il pellet, composto dalle cellule sedimentate, è stato recuperato e conservato a -80°C.

## **BIOPSIE CUTANEE**

Le biopsie di cute sono state prelevate sia da pazienti psoriasici che da donatori sani con un punch di 4mm. I pazienti al momento del prelievo non erano sottoposti da 1 mese a nessun tipo di trattamento topico o sistemico per la psoriasi o altre patologie. Per uno stesso paziente

è stata prelevata sia cute non lesionale che cute psoriasica. Le biopsie di cute non lesionale e di cute psoriasica insieme a quelle di cute normale dei donatori sani sono state trattate con un enzima, la Dispasi II per 2 ore a 37 °C, al fine di rompere gli emidesmosomi che ancorano lo strato epidermico al derma sottostante. In questo modo è possibile isolare il foglietto epidermico, che, successivamente, viene dissociato nelle singole cellule mediante trattamento con Tripsina 0,25% + EDTA 0,02%, in modo da avere una popolazione costituita principalmente da cheratinociti (80%).

### **PREPARAZIONE DI ESTRATTI PROTEICI TOTALI**

I cheratinociti e le cellule HaCat sono state risospesi nel tampone di lisi (Ripa-buffer: Tris-HCl 50 mM pH7,5, NaCl 150 mM, 1% deossicolato, 1% Triton X-100, 0,1% SDS e arricchito di inibitori di proteasi e fosfatasi) in modo da ottenere gli estratti cellulari. Dopo incubazione a 4 °C per 1h e vortexando ogni 10 minuti, questi vengono centrifugati a 13000 rpm per 20 minuti in modo da separare il surnatante, costituente l'estratto proteico totale, che viene recuperato. La concentrazione proteica è stata determinata secondo il metodo di Bradford (1976) usando il reattivo "*Protein assay kit*" della Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). Siamo riusciti ad ottenere circa 10-12 µg di proteine totali per biopsia.

### **WESTERN-BLOTTING**

Alle proteine totali dell'estratto cellulare e delle biopsie (10µg) è stato aggiunto il colorante composto da: Tris-HCl 2M pH 6,8, SDS 20%, β-Mercaptoetanolo, Glicerolo e Blu di Bromofenolo 5%. I campioni sono stati denaturati per 5 minuti a 95°C. Le proteine sono state separate mediante elettroforesi verticale su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) secondo Laemli, utilizzando un *resolving gel* al 12%. La corsa elettroforetica avviene a 80V per lo *stacking gel* e a 100 V per il *running gel* utilizzando un tampone di corsa costituito da Glicina



192 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%. Dopo la corsa elettroforetica, le proteine sono state elettrotrasferite su una membrana di nitrocellulosa (Hybond-ECL, Amersham Biosciences) ad una corrente costante di 100V in un *Trans-Blot system apparatus* (Bio-Rad) per 1h a freddo, utilizzando come tampone di trasferimento, metanolo 20% e Tris-glicina 5%. La membrana di nitrocellulosa è stata incubata in una prima fase con una soluzione di latte scremato in polvere (Bio-Rad) al 5%, come agente bloccante e, successivamente con l'anticorpo primario anti-BCL-XL (BD Transduction Laboratories), diluito 1:1000 in una soluzione di TTBS (NaCl 137 mM, KCl 2,69mM, TRIS 25mM e Tween-20 01%) con l'aggiunta di latte scremato al 5% per 2h a temperatura ambiente. Le bande immunoreattive vengono rivelate mediante anticorpo secondario (IgG anti-Rabbit coniugato con perossidasi da rafano) (R&D System), diluito 1:10000 in TTBS, ed evidenziate con metodo di rivelazione per ECL. Il metodo si basa sull'ossidazione del luminolo indotto dalla perossidasi (in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in condizioni alcaline. Il luminolo ossidato passa ad uno stato eccitato da cui decade con emissione di luce. L'esposizione della membrana per 5 minuti con reagenti per ECL (Amersham Biosciences), ad una lastra autoradiografica (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) permette di evidenziare le bande immunoreattive con una sensibilità teorica che è nell'ordine dei nanogrammi. Le immagini dei western blot ottenute saranno acquisite mediante scansione ed elaborate utilizzando il programma Adobe Photoshop. L'intensità delle bande viene quantificata mediante densitometria utilizzando il programma ImageJ v1.29 (sviluppato da Wayne Rasband), che fornisce il valore relativo alla frazione di BCL-XL deamidata e nativa, normalizzato sulla  $\beta$ -actina.

## **SAGGIO DI DEAMIDAZIONE DI BCL-XL IN VITRO**

Per il saggio di deamidazione in vitro è stata utilizzata la proteina ricombinante umana BCL-XL (R&D Systems 1,02 mg/mL), la cui sequenza comprende gli aminoacidi 1-212 e manca di

21 aminoacidi all'estremità C-terminale, che sono sostituiti da una coda di istidine. Il primo campione è stato deamidato in una soluzione altamente alcalina per 6h e 18 h secondo il protocollo di Aswad *et al.*, 1993, l'altro campione è stato invece incubato per 6h e 18 h in una soluzione a pH neutro. I due campioni al termine dell'incubazione sono stati quindi liofilizzati per la successiva analisi. Successivamente i campioni sono stati trattati a 37°C per 12 ore con una soluzione 1mg/mL di tripsina (che taglia i residui Lis-Arg) in  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  (AMBIC) 50mM a pH 8 per dividere la proteina in peptidi. Successivamente il campione viene bollito a 99°C per 5 minuti e nuovamente liofilizzato e lo si sottopone ad una seconda reazione di idrolisi con una soluzione 1mg/mL di Asp/N (consente il taglio proteolitico sui residui di acido aspartico) in  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  (AMBIC) 50mM a pH 8. La reazione enzimatica viene arrestata mediante una seconda liofilizzazione. I campioni vengono risospesi in acqua e desalificati mediante il metodo ZipTip. La miscela peptidica viene miscelata con la matrice  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamminico (SIGMA), in modo da poter essere analizzata allo spettrometro di massa MALDI.

#### **ANALISI MEDIANTE MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION (MALDI/MS)**

La miscela peptidica viene caricata negli opportuni pozzetti della piastra portacampioni dello spettrometro e lasciata essiccare all'aria, per consentire la formazione dei cristalli di matrice in cui il campione peptidico resta intrappolato. La piastra portacampioni viene introdotta nella camera di ionizzazione dove in condizioni di alto vuoto il campione viene bombardato mediante un raggio laser pulsato tra 1 e 10 ns. L'intervallo di massa/carica ( $m/z$ ) analizzato è stato calibrato usando standard interni aventi un determinato valore di massa.

Gli spettri sono stati acquisiti utilizzando uno spettrometro di massa MALDI Voyager DE-PRO (Applied Biosystems) a sorgente di ionizzazione laser equipaggiato con analizzatore a tempo di volo in grado di separare gli ioni in modalità reflectron.

## **ISOLAMENTO DELLA PROTEINA BCL-XL MEDIANTE TECNICHE DI IMMUNOPRECIPITAZIONE**

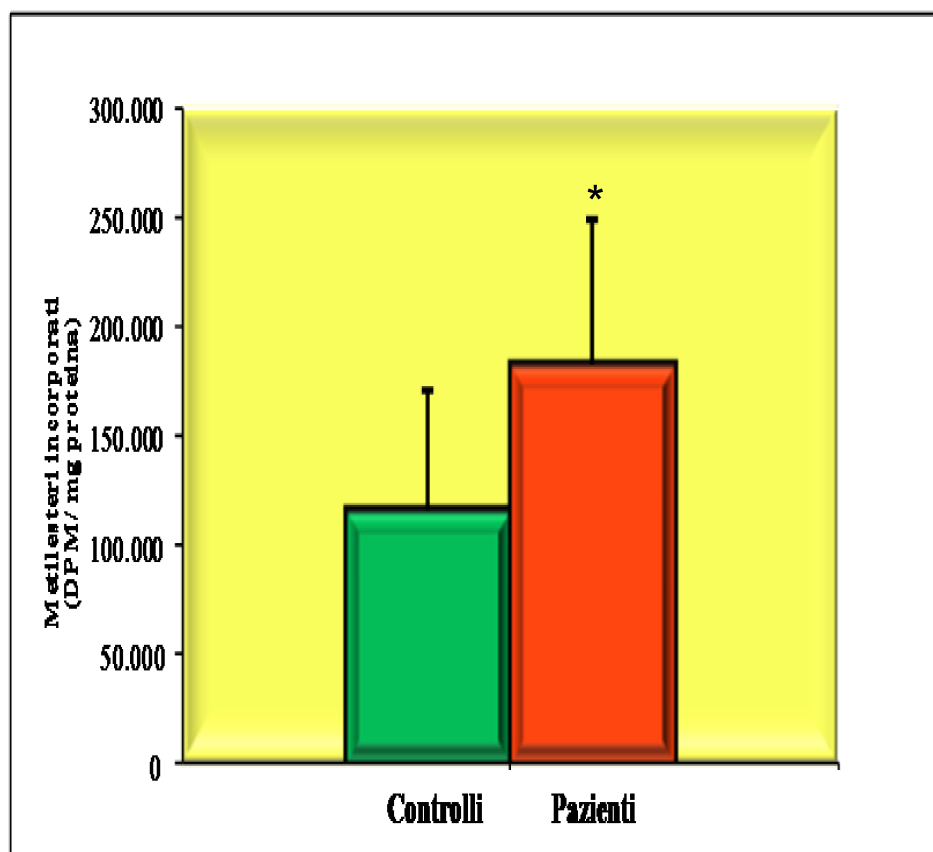
Per poter isolare la proteina BCL-XL da un estratto di cellule HaCat è stato eseguito un esperimento di immunoprecipitazione, che sfrutta l'alta affinità del legame tra l'anticorpo e la proteina contro cui è stato prodotto, permettendo una buona resa di purificazione. Gli estratti proteici totali (2mg) sono stati incubati con resine coniugate ad anticorpi aspecifici, *Protein G-agarose beads* (ROCHE) per 4-12 ore a 4°C (***Pre-cleaning***). La miscela (Protein G-Agarose beads + estratto proteico totale) è stata centrifugata per 5 minuti a 2000 rpm. Il surnatante è stato recuperato e incubato con nuove *Protein G-Agarose beads* per 4 ore a 4°C. (***2° Pre-cleaning***). La miscela è stata nuovamente centrifugata ed il surnatante è stato incubato con l'anticorpo specifico per immunoprecipitazione, anti-BCL-XL (7B2.5 Santa-Cruz). Le quantità di anticorpo utilizzate sono descritte nel data-sheet (sc-56021). La soluzione contenente l'estratto proteico e l'anticorpo è stata nuovamente incubata con le *Protein G-Agarose beads* o.n. Dopo centrifugazione, il surnatante, che costituisce l'*unbound*, è stato eliminato mentre la resina è stata lavata prima con PBS 1X a bassa salinità (NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9.1 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.7 mM) poi con il tampone PBS 1X ad alta salinità (NaCl 300mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9.1 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.7 mM) ed infine nuovamente col PBS 1X a bassa salinità. L'eluizione dei complessi legati alle beads è stata effettuata utilizzando una soluzione di *loading buffer* (200 mM Tris/Cl pH 6.8; 8% SDS; 0,4% blu di bromofenolo; 40% glicerolo). I campioni sono stati bolliti per 5 minuti ed analizzati mediante western-blotting.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### DEAMIDAZIONE DELLE PROTEINE DELLA MEMBRANA ERITROCITARIA IN PAZIENTI AFFETTI DA PSORIASI A PLACCHE

Esperimenti condotti nel nostro laboratorio di ricerca hanno dimostrato una maggiore vulnerabilità delle proteine di membrana eritrocitaria nei confronti delle reazioni di isomerizzazione/deamidazione in seguito all'esposizione ad eventi di stress ossidativo (Ingrosso *et al.*, 2000), suggerendo una possibile correlazione tra la formazione di residui aspartilici anomali ed il danno alle proteine di tipo ossidativo. Essendo la psoriasi notoriamente associata ad uno *status* pro-ossidante, è sembrato ragionevole ipotizzare che l'accumulo di residui aspartilici anomali, potenzialmente responsabili di alterazioni strutturali e funzionali delle proteine, sia una caratteristica fenotipica che accompagna la psoriasi a placche. Allo scopo di verificare l'ipotesi di un accumulo di residui isoaspartilici nelle proteine di membrana degli eritrociti di pazienti affetti da psoriasi, è stato allestito un saggio radiochimico *in situ*. Tale saggio, che ha lo scopo di valutare la capacità metilaccettrice delle proteine di membrana nel globulo rosso intatto, viene condotto incubando le cellule in presenza di L-[metil-<sup>3</sup>H]-metionina, il precursore *in vivo* del donatore di metili AdoMet. Data la completa assenza di sintesi proteica negli eritrociti, è possibile assumere che, in queste condizioni, tutta la metionina trasportata all'interno dell'eritrocita venga utilizzata dall'enzima citosolico ATP-dipendente, MAT, per la sintesi di AdoMet, senza incorrere nell'interferenza dovuta alla sua incorporazione nello scheletro peptidico delle proteine. L'enzima PIMT endogeno potrà dunque utilizzare l'AdoMet radiomarcata per la metilesterificazione dei residui isoaspartilici esposti sul versante citosolico della membrana plasmatica. Al termine dell'incubazione, le membrane eritrocitarie vengono isolate, la radioattività ad esse associata è misurata tramite scintillazione in fase liquida e normalizzata

rispetto al contenuto di proteine totali. Con questa strategia è dunque possibile misurare quantitativamente i livelli di carbossimetilazione e avere, indirettamente, una stima dell'entità del danno che le proteine degli eritrociti hanno accumulato in circolo e che il sistema di riparazione endogeno non è riuscito a correggere. Lo studio è stato condotto su un gruppo di 36 pazienti affetti da psoriasi a placche e 36 soggetti sani di controllo, omogenei per età e sesso. Il risultato del saggio, mostrato in figura 27, ha indicato come **nel nostro campione di pazienti psoriasici le proteine di membrana degli eritrociti mostrano una più spiccata tendenza all'accumulo di residui anomali rispetto alla popolazione di controlli sani ( $182129 \pm 67367$  DPM/mg proteine vs  $115870 \pm 54041$  DPM/mg proteine;  $p < 0.0001$ )**. Tale differenza, statisticamente significativa, mostra chiaramente che i livelli di isoAsp accumulatisi nelle proteine di membrana di pazienti psoriasici eccedono largamente quelli ritrovati nei campioni impiegati come controllo e dimostra un notevole incremento dei fenomeni di deamidazione dei residui labili di Asn in tali pazienti, almeno per quanto concerne le proteine della membrana eritrocitaria, modello di questo studio.



**Figura 27. Saggio di carbossimetilazione *in situ* delle proteine di membrana eritrocitaria.**

Metilesterificazione delle proteine di membrana di eritrociti intatti in pazienti affetti da psoriasi a placche a confronto con un gruppo omogeneo di volontari sani. La differenza osservata tra i soggetti affetti da psoriasi a placche ed i controlli risulta statisticamente significativa (\* $p < 0.0001$ ).

## IDENTIFICAZIONE DEI PRINCIPALI SUBSTRATI METIL-ACCETTORI

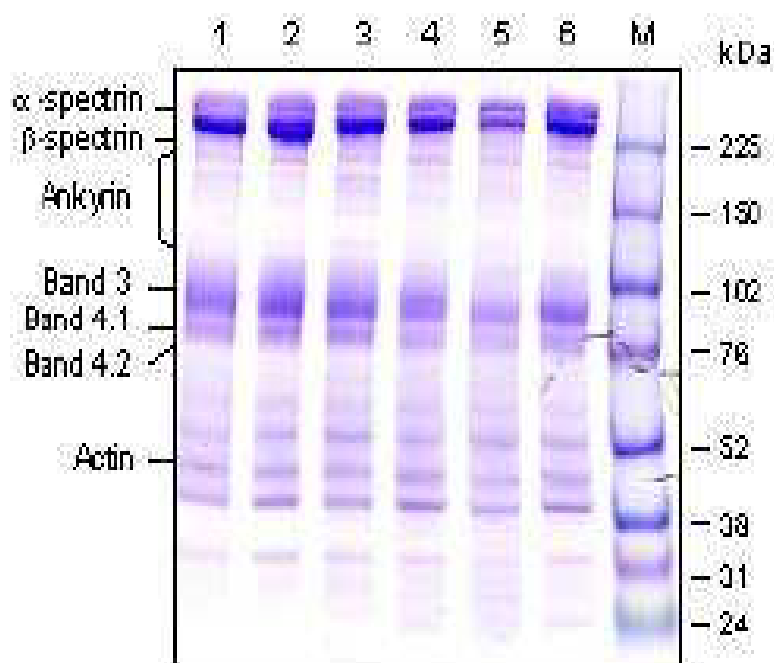
E' noto che i principali substrati metilaccettori negli RBC umani sono costituiti dalla proteina integrale di membrana *banda 3* e da componenti del citoscheletro quali l'*anchirina*, la *banda 4.1* e la *banda 4.2* (Galletti *et al.* 1995). Aumentati livelli di metilesterificazione di una o più di queste proteine sono stati associati non solo al fenomeno dell'invecchiamento cellulare, in cui la banda 4.1 e la banda 3 appaiono le specie contraddistinte dalla maggiore propensione alla deamidazione (Galletti P. *et al.* 1995), ma anche a diverse condizioni patologiche, quali la sferocitosi ereditaria (Ingrosso D. *et al.* 1995). Quest'ultima consiste in un'alterazione ematica caratterizzata da anemia emolitica e da un'aumentata fragilità osmotica essenzialmente associata ad un *deficit* di spectrina che, dal punto di vista quantitativo, può essere considerata la proteina maggioritaria del citoscheletro. La disorganizzazione del *network* citoscheletrico che ne consegue è stata considerata come uno dei principali meccanismi responsabili dell'incremento di siti metil-esterificabili nelle proteine di membrana, che si ripercuotono prevalentemente sull'*anchirina* identificata come la principale sede di accumulo di tali danni molecolari (Ingrosso D. *et al.* 1995). E' stato, inoltre, dimostrato che il substrato preferenziale della metilesterificazione, quando gli eritrociti sono esposti *in vitro* a condizioni di *stress* ossidativo, è la banda 4.1, proteina di importanza cruciale nel mantenimento della stabilità del complesso membrana-citoscheletro (Ingrosso D. *et al.* 2002).

Allo scopo di identificare le principali specie proteiche metilaccettrici della membrana eritrocitaria in pazienti affetti da psoriasi a placche, membrane purificate ottenute da globuli rossi intatti metil esterificati *in situ* sono state analizzate mediante elettroforesi verticale in condizioni denaturanti come descritto nei Metodi. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti, nelle stesse condizioni sperimentali, in campioni di cellule controllo.

#### a) ANALISI ELETTROFORETICA DELLE PROTEINE DI MEMBRANA

L'analisi elettroforetica delle proteine di membrana metilesterificate in globuli rossi intatti è stata condotta in contemporanea su campioni eritrocitari di un soggetto sano e di un paziente con psoraisi. Dopo la corsa elettroforetica il gel è stato tagliato in due metà di cui una è stata colorata con il *Coomassie Brilliant Blue*.

La figura 28 mostra che, nelle condizioni sperimentali impiegate, **il profilo elettroforetico delle proteine di membrana eritrocitaria derivanti da RBC di pazienti psoriasici risulta perfettamente sovrapponibile a quello ottenuto per i controlli**. In tal modo, è stato possibile escludere che fenomeni di frammentazione e/o di aggregazione, eventi che si associano ai processi di invecchiamento del globulo rosso, siano alla base dell'osservato incremento dei livelli di metilesterificazione delle proteine di membrana osservato in pazienti con psoriasi a placche.

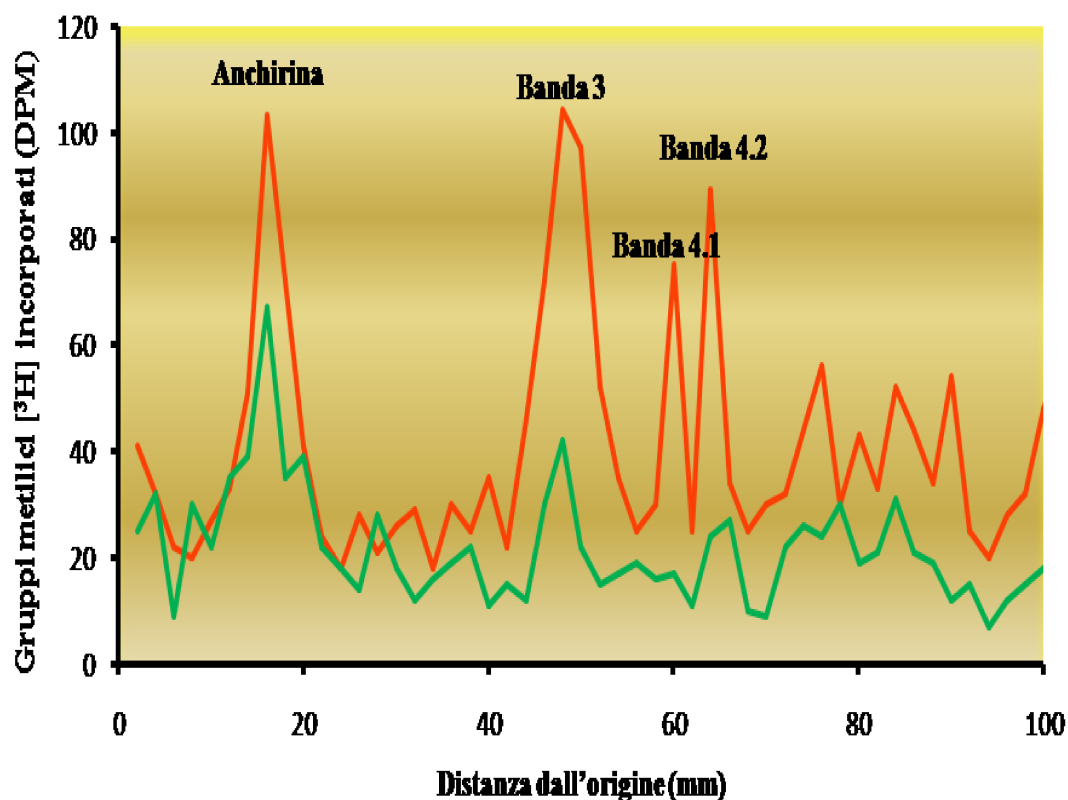


**Figura 28.** Caratterizzazione delle proteine della membrana eritrocitaria di pazienti con psoriasi e controlli. Proteine di membrana (~40 µg) ottenute dalla lisi ipotonica di RBC sottoposti ad incubazione con [<sup>3</sup>H]-Met sono state analizzate mediante elettroforesi verticale denaturante. Il profilo elettroforetico è conservato. Lane 1-2-3: RBC di paziente con psoriasi; Lane 4-5-6: RBC di controllo.



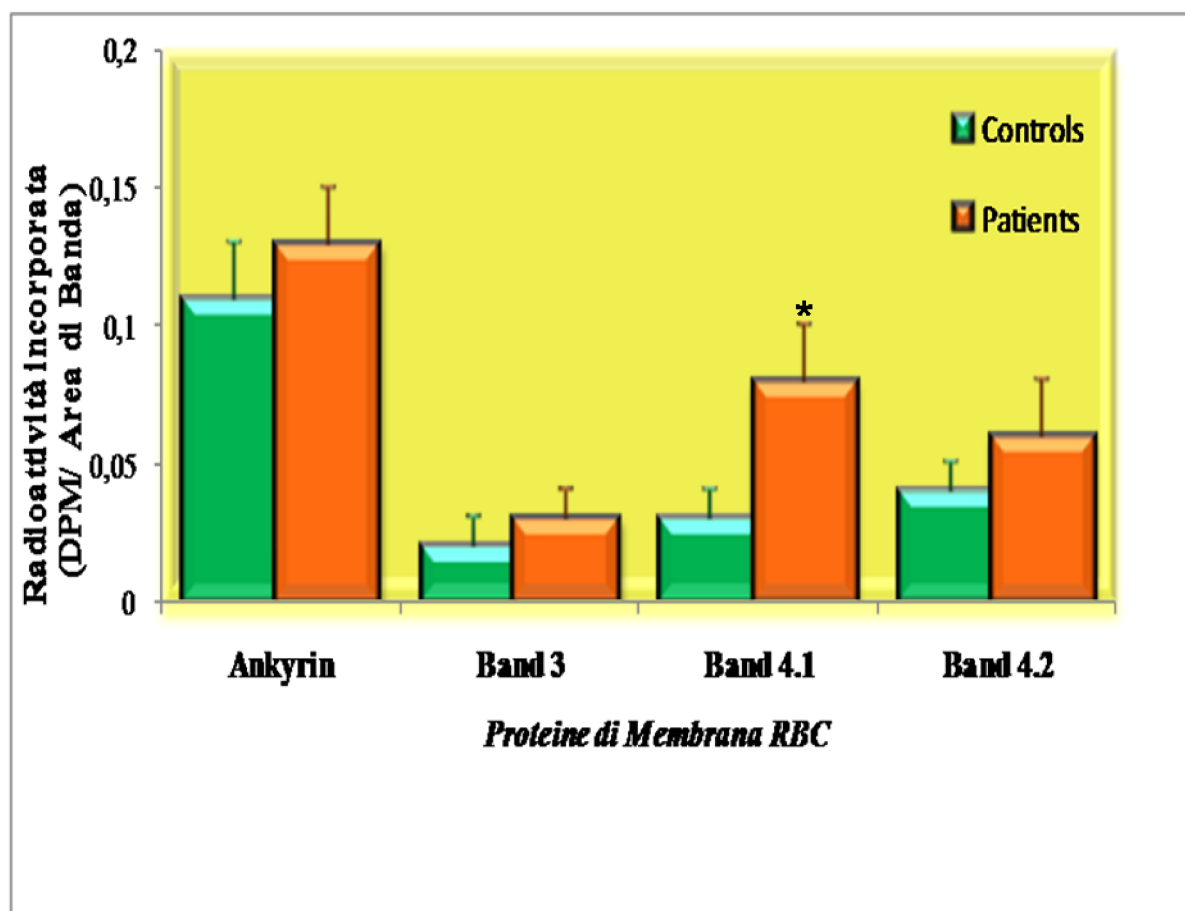
**b) IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE DI MEMBRANA SUBSTRATO DELLA PCMT**

L'identificazione delle principali specie proteiche metilaccettrici è stata condotta impiegando l'altra metà del gel che, tagliata in strisce di 2 mm, è stata utilizzata per il conteggio della radioattività incorporata nelle proteine di membrana. Come illustrato in figura 29 il *pattern di metilazione delle proteine di membrana eritrocitaria nei campioni patologici è perfettamente sovrapponibile a quello osservato nei controlli*. Tuttavia, i picchi di radioattività in corrispondenza dell'anchirina, della banda 3, della 4.1 e della 4.2, nei campioni di pazienti psoriasici risultano superiori a quelli dei campioni controllo. Tale risultato permette di escludere che negli eritrociti di pazienti psoriasici abbiano subito il processo di deamidazione specie proteiche che non sono normalmente deamidate nell'eritrocita umano normale. Pertanto, l'incremento della metilazione delle proteine di membrana osservato negli eritrociti di pazienti psoriasici può ritenersi imputabile esclusivamente alla maggiore propensione alla deamidazione di quelle stesse proteine che fisiologicamente subiscono tale processo nel corso dell'invecchiamento cellulare.



**Figura 29. Profilo di radioattività di un tracciato elettroforetico (SDS-PAGE) di proteine di membrana eritrocitaria di pazienti con psoriasi e controlli.** E' stato delineato il profilo della radioattività incorporata da ciascuna specie proteica metilesterificata *in situ* in funzione della distanza percorsa sul gel. Il *pattern* di metilazione delle proteine esaminate è conservato in pazienti e controlli.

Nell'ambito di ciascun set di dati è stata, inoltre, valutata la percentuale di radioattività associata alle singole proteine metilaccettrici rispetto alla radioattività incorporata *in toto* dalle membrane. La radioattività incorporata dalle singole specie proteiche è stata normalizzata in funzione della concentrazione di ciascuna banda proteica, espressa come valore dell'area superficiale sottesa alla curva densitometrica (dati riportati in figura 30).



**Figura 30. Caratterizzazione delle proteine di membrana metilesterificate in eritrociti intatti di pazienti con psoriasi e controlli.** L'identificazione delle principali specie metilaccettrici è stata condotta dopo incubazione degli RBC in presenza di [ $^3\text{H}$ ]-metionina. Ogni campione proteico, dopo lisi cellulare ipotonica, è stato analizzato in doppio mediante SDS-PAGE e successivamente sottoposto sia all'analisi densitometrica per la quantificazione di ciascuna specie proteica, sia al conteggio della radioattività incorporata. La banda 4.1 è l'unica specie proteica per la quale è stata evidenziata, tra pazienti psoriasici e controlli, una differenza statisticamente significativa nell'incorporazione di metilesteri (\* $p<0.01$ ).

**Tale analisi mostra che l'incremento di incorporazione di metilesteri nella banda 4.1 degli RBC dei pazienti psoriasici risulta aumentata in maniera statisticamente significativa rispetto ai controlli ( $P < 0.01$ ). La banda 4.1 è una proteina particolarmente prona a subire questo genere di danni in seguito all'esposizione ad agenti destabilizzanti di vario tipo. E' stato, infatti, riportato che questa proteina è il principale bersaglio dei danni provocati sia da uno *stress* ossidativo indotto, che da uno *stress* ossidativo endogeno, come quello presente in eritrociti con *deficit* di G6PD (Ingrosso D. *et al.* 2000; Ingrosso D. *et al.* 1995). Pertanto l'evidenza che la banda 4.1 sia la componente proteica selettivamente ipermetilata nei pazienti psoriasici permette di ipotizzare che l'accumulo di residui isoaspartilici sia soprattutto riconducibile allo *stress ossidativo* cronico cui sono sottoposti gli RBC di pazienti affetti da psoriasi. Inoltre, la banda 4.1 assicura punti di ancoraggio tra le proteine integrali immerse nel *bilayer* lipidico ed il sottostante citoscheletro, svolgendo allo stesso tempo un ruolo critico sia nel mantenimento della stabilità del *network* membrana-citoscheletro, sia nel mantenimento della caratteristica deformabilità del globulo rosso (figura 31). Pertanto, è possibile ipotizzare che un'aumentata deamidazione della banda 4.1, destabilizzando il *network* membrana-citoscheletro, possa rappresentare uno dei più precoci eventi del processo di condizionamento cellulare e di emocateresi.**

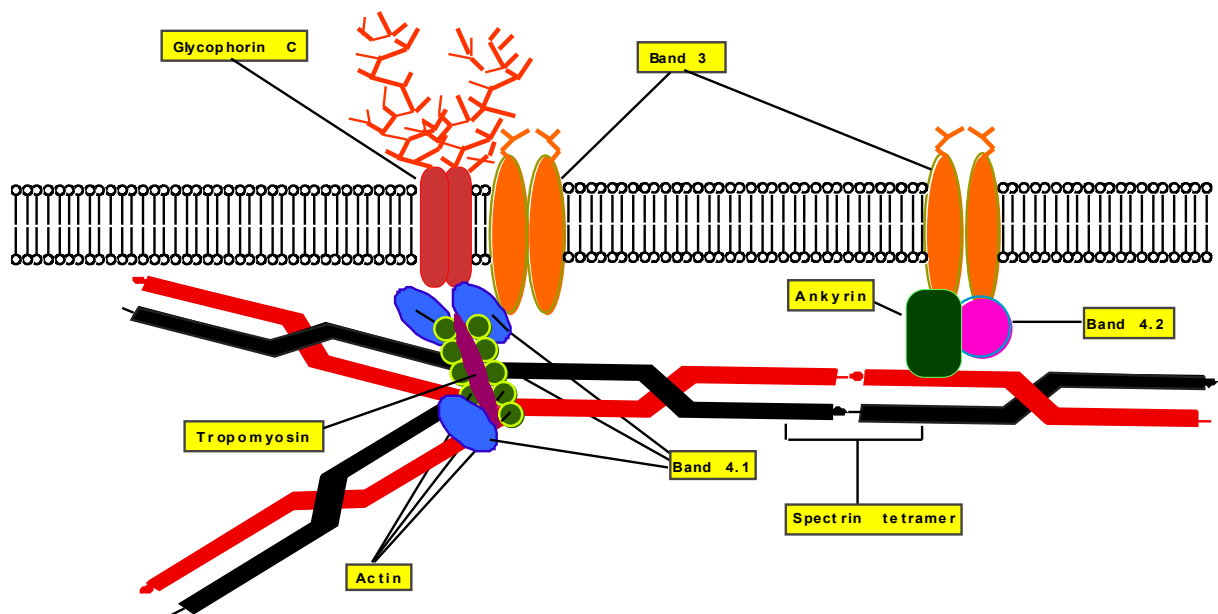


Figura 31. Struttura schematica del *network* membrana-citoscheletro della cellula eritrocitaria con evidenziate le principali specie proteiche coinvolte.

## ANALISI DEL MACCHINARIO BIOCHIMICO COINVOLTO NELLA RAZIONE DI METILESTERIFICAZIONE PROTEICA

La presenza di residui isoaspartilici nelle proteine di membrana eritrocitaria può dipendere, oltre che dalla labilità intrinseca dei residui asparaginilici e, quindi, dalla loro effettiva tendenza a subire spontaneamente reazioni di deamidazione, anche dall'efficienza con cui tali residui, una volta formati, possono essere riparati dalla PIMT. E' inevitabile, dunque, che un tale processo di riparazione, basato su una reazione di metilesterificazione in cui il gruppo metilico ceduto è quello trasportato dalla AdoMet, sia influenzato dal *pathway* metabolico degli aminoacidi solforati.

L'efficienza del processo di metilazione-riparazione è stato valutato in eritrociti intatti provenienti sia da pazienti psoriasici sia da soggetti sani di controllo. Allo scopo di verificare il corretto funzionamento del macchinario biochimico alla base del processo di riparazione dei

residui isoaspartilici, sono stati analizzati alcuni parametri biochimici che potrebbero influenzare il procedere della reazione di metilesterificazione negli eritrociti:

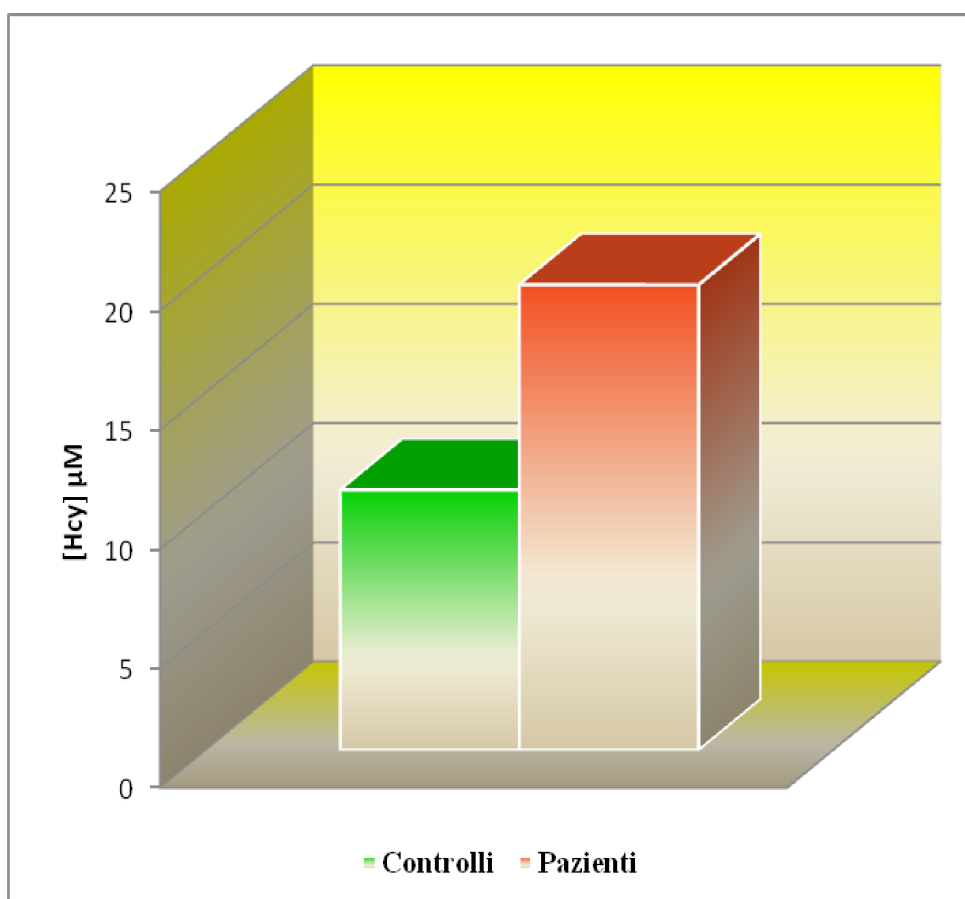
- concentrazione plasmatica di Hcy;
- attività specifica dell'enzima PIMT;
- concentrazione intracellulare del donatore di gruppi metilici, l'AdoMet, e del suo prodotto demetilato, l'AdoHcy;
- valore del potenziale di transmetilazione.

### **MISURA DELL'OMOCISTEINA PLASMATICA**

E' stato riportato che, nella psoriasi, modificazioni del metabolismo degli aminoacidi solforati, conseguenti ad un aumento nel consumo di folato da parte dell'epidermide, si manifestano a livello plasmatico con un aumento dei livelli di tHcy (Malerba *et al.*, 2006). E' ragionevole ipotizzare, quindi, che variazioni in tal senso della concentrazione dei metaboliti solforati siano in grado di modificare l'andamento delle reazioni di transmetilazione, influenzando l'efficienza del processo di riparazione. A partire dal plasma ottenuto per centrifugazione del prelievo ematico, abbiamo misurato i valori di tHcy di pazienti psoriasici e soggetti sani di controllo. In accordo con i dati di letteratura è stato ritrovato, anche nei pazienti affetti da psoriasi a placche reclutati nel nostro studio, un aumento delle concentrazioni plasmatiche di tHcy (tabella II e figura 32). In particolare, **il pool plasmatico di tHcy nei campioni patologici risulta significativamente aumentato rispetto al valore osservato nel gruppo di controllo ( $19,5 \mu\text{M} \pm 16,5$  vs  $10,9 \mu\text{M} \pm 4$  ;  $p < 0.006$ ).**

	Concentrazione plasmatica di Hcy ( $\mu\text{M}$ )
<b>CONTROLLI</b> ( <i>n=18</i> )	<b>10,9<math>\pm</math>4</b>
<b>PAZIENTI</b> ( <i>n=35</i> )	<b>19,5<math>\pm</math>16,5</b>

**Tabella II. Valori di omocisteina plasmatica.** La tabella riporta i valori di Hcy plasmatica misurati in pazienti psoriasici e controlli sani mediante dosaggio immunologico a fluorescenza con luce polarizzata (FPIA).



**Figura 32. Concentrazione plasmatica di omocisteina (Hcy) di pazienti psoriasici e controlli sani.** Nei pazienti psoriasici, rispetto ai controlli, come si evince dal grafico, è confermato un aumento della concentrazione di Hcy plasmatica totale nell'ambito della casistica valutata.

## DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ SPECIFICA DELLA PIMT

La PIMT, enzima costitutivo altamente conservato in natura, è notoriamente stabile in diverse condizioni ambientali, anche estreme. È stato, infatti, dimostrato che condizioni di stress cellulare, come ad esempio shock termici e/o stress di tipo ossidativo, non inducono variazioni significative dell'attività specifica di questo enzima (Ladino *et al.*, 1992). Al fine di stabilire se l'estrema stabilità dell'enzima osservata in altri sistemi, sussiste anche in pazienti psoriasici, ed escludere dunque che un'eventuale perdita di attività dell'enzima PIMT sia alla base dell'accumulo di residui deamidati nelle proteine della membrana dell'eritrocita di questi pazienti, è stata misurata l'attività specifica dell'enzima citosolico in estratti eritrocitari ottenuti dai pazienti. Come riportato in tabella III, **i valori di attività specifica misurati negli eritrociti dei pazienti, espressi come U/mg Hb, risultano perfettamente paragonabili a quelli ottenuti dai soggetti sani. Un tale risultato ci permette di escludere l'ipotesi secondo cui l'incremento di deamidazione sia imputabile ad una mancata riparazione dei residui isoaspartilici a causa di un *deficit* di attività della metiltrasferasi.**

	Attività Specifica della PIMT (U/ mg Hb)
<b><i>CONTROLLI</i></b> <b><i>(n=15)</i></b>	<b>2,6±0,6</b>
<b><i>PAZIENTI</i></b> <b><i>(n=35)</i></b>	<b>19,5±16,5</b>

**Tabella III. Attività specifica della PIMT in RBC di pazienti con psoriasi e controlli sani.** I valori di attività specifica misurati in eritrociti di pazienti e controlli confermano il perfetto funzionamento della PIMT nei pazienti affetti da psoriasi. I risultati sono espressi come media ± Deviazione Standard.



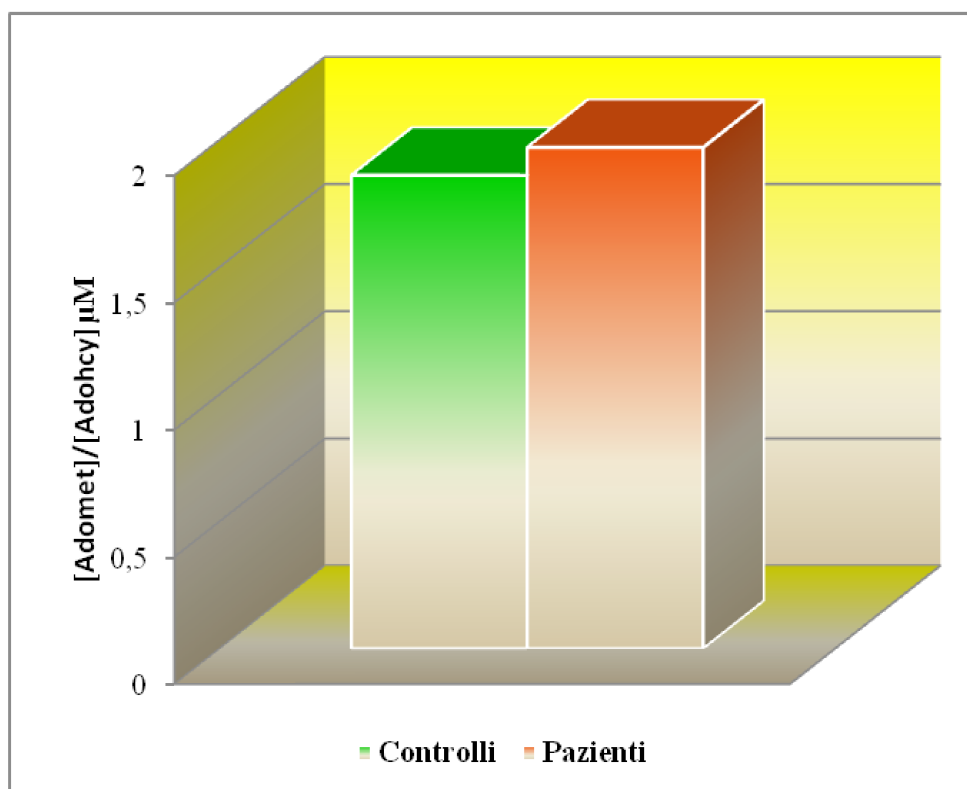
## CONCENTRAZIONI INTRAERITROCITARIE DI ADOMET E ADOHCY E POTENZIALE DI TRANSMETILAZIONE

Per quanto concerne le concentrazioni dei nucleosidi solforati AdoMet e AdoHcy, occorre sottolineare che la  $K_m$  apparente dell'enzima per il substrato AdoMet è dello stesso ordine di grandezza delle concentrazioni intracellulari del composto disolfonio. D'altro canto, l'AdoHcy è un potente inibitore competitivo di tutte le transmetilazioni AdoMet-dipendenti, con una  $K_i$  addirittura più favorevole rispetto al valore della  $K_m$  per il substrato. Allo scopo di verificare se l'aumento della deamidazione che abbiamo evidenziato nelle proteine di membrana degli eritrociti di pazienti psoriasici è causato dalla condizione di stress ossidativo a cui queste cellule sono esposte, e/o da un alterato potenziale di transmetilazione (indice della capacità cellulare di trasferire gruppi metilici), abbiamo dosato le concentrazioni intraeritrocitarie di AdoMet e AdoHcy tramite cromatografia liquida ad alta pressione HPLC. Come si evince dai dati riportati in tabella IV, **non è stata individuata alcuna differenza significativa, per la casistica di campioni da noi esaminata, relativamente alle concentrazioni dei nucleosidi solforati AdoMet e AdoHcy. Infatti, la concentrazione di entrambi i metaboliti all'interno dei globuli rossi è risultata non essere diversa tra pazienti e controlli. L'assenza di alterazioni nell'ambito della concentrazione di AdoMet e AdoHcy nei globuli rossi di pazienti psoriasici, ci permette di escludere che l'aumentata incorporazione di gruppi metilici, ritrovata nelle proteine di membrana mediante il saggio *in situ* sia, in qualche modo, riconducibile a modificazioni delle concentrazioni intraeritrocitarie di questi metaboliti.** Tali variazioni nella concentrazione di nucleosidi solforati, non sono di conseguenza sufficienti a determinare un potenziale di transmetilazione significativamente differente nei pazienti rispetto ai soggetti sani di controllo (tabella IV e figura 33). **Questi risultati non sembrano supportare l'ipotesi che l'accumulo di residui deamidati sia la conseguenza di una scarsa efficienza dell'enzima che provvede alla**

riparazione e lasciano aperta la possibilità, ancora da confermare, che l'instaurarsi di uno stress di tipo ossidativo sia il maggiore determinante nella produzione di residui isoaspartilici in eccesso negli eritrociti di questi pazienti.

	<b>CONTROLLI</b> <i>(n=18)</i>	<b>PAZIENTI</b> <i>(n=23)</i>		<b>[AdoMet]/[AdoHcy]</b>
<b>AdoMet</b> <b>(<math>\mu</math>M)</b>	<b>1,14<math>\pm</math>1,17</b>	<b>1,15<math>\pm</math>0,63</b>	<b>CONTROLLI</b>	<b>1,86<math>\pm</math>0,89</b>
<b>AdoHcy</b> <b>(<math>\mu</math>M)</b>	<b>0,77<math>\pm</math>0,51</b>	<b>0,65<math>\pm</math>0,29</b>	<b>PAZIENTI</b>	<b>1,97<math>\pm</math>0,85</b>

**Tabella IV.** Valori AdoMet e AdoHcy e potenziale di transmetilazione di pazienti e controlli. I risultati sono espressi come media  $\pm$  Deviazione Standard.

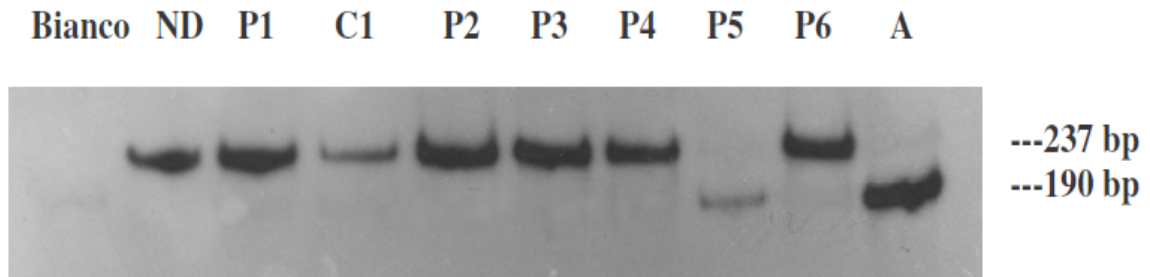


**Figura 33.** Potenziale di transmetilazione [AdoMet]/[AdoHcy]. Nella figura sono mostrati a confronto i valori ottenuti, rispettivamente, in pazienti e soggetti sani di controllo.

## ANALISI DELL'ESPRESSIONE ALLELICA DI SYBL1

Il potenziale di transmetilazione è un parametro indicativo dell'efficienza delle reazioni di trasferimento di gruppi metilici catalizzate da enzimi sensibili all'inibizione esercitata dall'AdoHcy. A questa categoria di enzimi appartengono, oltre alla PIMT, le DNA metiltrasferasi, enzimi grazie ai quali il corretto profilo di metilazione del DNA viene instaurato e successivamente mantenuto nel corso delle divisioni cellulari. Sebbene il potenziale di transmetilazione non abbia mostrato significative alterazioni nei pazienti psoriasici rispetto ai controlli, è comunque ragionevole attendersi un'alterazione del corretto livello di metilazione del DNA. Come già menzionato, infatti, esistono in letteratura evidenze a favore di un'ipometilazione genomica in questi pazienti e della riattivazione di geni ad espressione tessuto-specifica nella cui regolazione la metilazione del promotore gioca un ruolo chiave. Ci è sembrato dunque interessante avere una indicazione, sebbene indiretta, del livello di metilazione del DNA, utilizzando come *marker* di ipometilazione la riespressione del gene pseudoautosomico SYBL1 che, come descritto nell'introduzione di questa tesi, è un gene ad espressione allele-specifica (inattivato sui cromosomi X e Y) il cui silenziamento è strettamente legato alla densità di metilazione dell'isola CpG. L'analisi dell'espressione di SYBL1 è stata condotta esclusivamente in pazienti maschi eterozigoti per un polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione (*Restriction Fragment Length Polimorphism*; RFLP) per l'enzima XhoI. Soltanto in questi pazienti, infatti, è possibile discriminare il trascritto proveniente da ciascuno dei due cromosomi sessuali e associare con sicurezza la presenza/assenza del sito di restrizione ad uno dei due alleli. Nelle femmine, invece, data l'inattivazione casuale di un cromosoma X o dell'altro, il sito sarà associato nel 50% dei casi all'allele attivo e nell'altro 50% a quello spento. **L'analisi dell'espressione di SYBL1, condotta in 4 pazienti, non ha mostrato alcuna riespressione dell'allele di SYBL1 presente sul cromosoma Y, che mantiene dunque il suo corretto profilo di espressione**

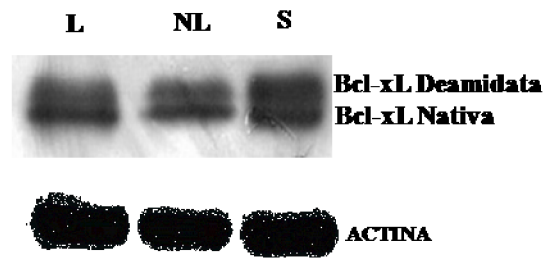
(figura 34). Questo risultato, sebbene non definitivo e non generalizzabile a tutto il genoma, non sembra dunque suggerire l'instaurarsi di una ipometilazione genomica a livello sistemico in pazienti affetti da psoriasi a placche.



**Figura 34. Analisi dell'espressione di SYBL1.** Ciascuna corsia corrisponde all'analisi effettuata su cDNA di soggetti di controllo (C) o pazienti (P) dopo amplificazione, marcatura e digestione con XhoI. In tutti i casi analizzati, soltanto la banda relativa all'allele espresso (cromosoma X) è visibile. Tale banda coincide, a seconda dei casi, con l'allele tagliato (190 bp) o a quello non tagliato (237 bp). Bianco: controllo negativo della reazione di amplificazione; A: controllo della completezza della digestione costituito da cDNA da soggetto omozigote per la presenza del sito di restrizione

## **ANALISI DELL'ISOFORMA DEAMIDATA DELLA PROTEINA BCL-XL NELLA PSORIASI A PLACCHE.**

La psoriasi è un disordine iperproliferativo dei cheratinociti che si differenziano in maniera anomala. Numerosi dati di letteratura riportano che la cute lesionale dei pazienti psoriasici è caratterizzata dall'*up-regulation* del trascritto di BCL-XL, che si traduce in un'iperespressione del suo prodotto proteico. Poiché BCL-XL inibisce l'apoptosi stimolata da vari stress cellulari e svolge un ruolo pilota nella sopravvivenza cellulare, è stato ipotizzato che, l'aumento della proliferazione epidermica, e, l'alterata architettura del tessuto psoriasico, potrebbero essere dovuti ad un pathway apoptotico anomalo, ossia ad uno sbilancio tra proteine pro- e anti-apoptotiche. In favore di queste ultime, il cui ruolo principale sarebbe svolto da BCL-XL. Inoltre, è riportato in letteratura che la proteina BCL-XL è un potenziale bersaglio di deamidazione a livello di due asparagine labili (Asn52 e Asn66) e che tale modificazione induce una perdita di funzione e conferisce a questa proteina proprietà pro-apoptotiche. Considerando queste premesse, abbiamo ritenuto interessante monitorare i livelli delle due isoforme di BCL-XL in cheratinociti primari isolati da biopsie di lesione psoriasica a confronto con cute non lesionale dello stesso paziente e con cute isolata da donatori sani. L'analisi è stata condotta tramite *western blot*, saggiando l'estratto proteico ottenuto dalla cute malata e sana con un anticorpo specifico anti-BCL-XL che consente la rivelazione di entrambe le isoforme, deamidata e nativa di questa proteina. **L'analisi dei campioni bioptici, mostrata in figura 35, ha evidenziato come nella cute di 10 diversi pazienti, indipendentemente dal carattere lesionale o non lesionale della stessa, l'isoforma deamidata di BCL-XL è meno abbondante rispetto a quanto si osserva nella cute di 10 diversi donatori sani. Questo risultato è in linea con la diminuzione dell'apoptosi riportata in letteratura nella genesi della placca psoriasica.**

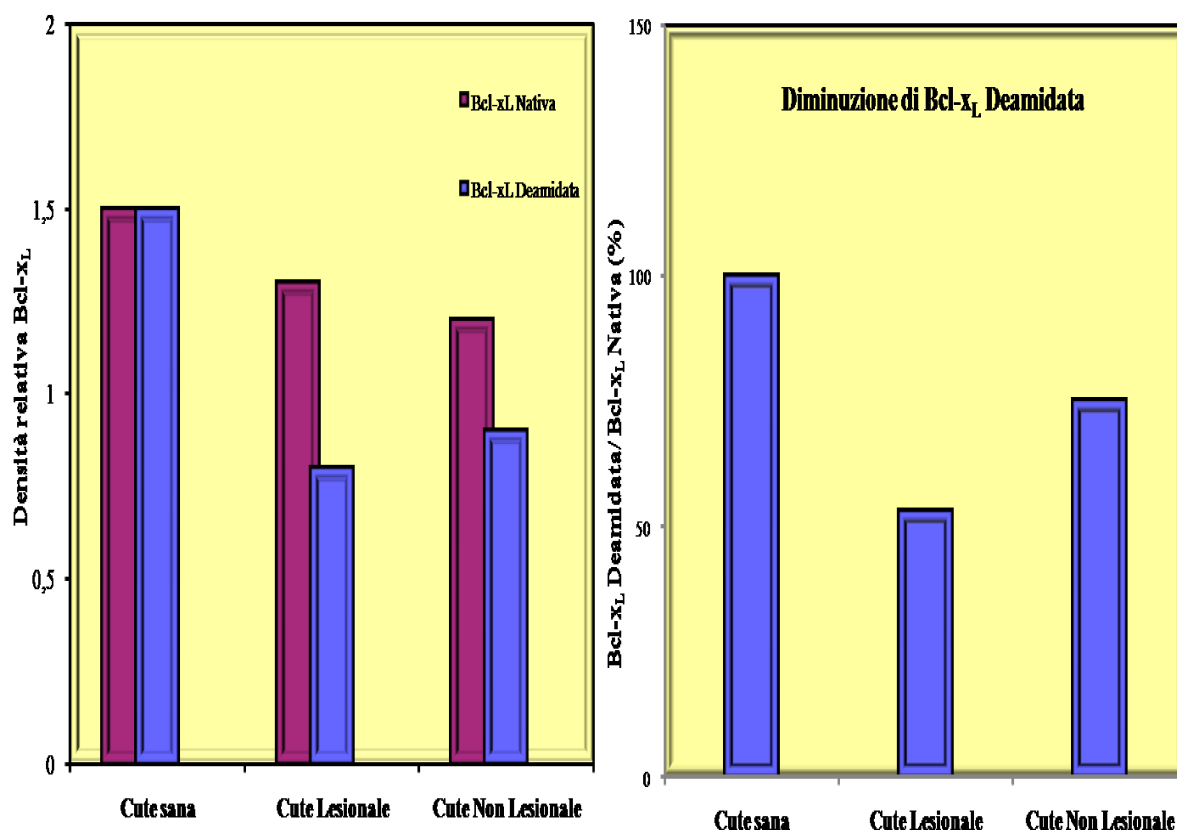


**Figura 35. Western blot con anticorpo diretto contro la proteina BCL-XL.** Il livello di deamidazione di BCL-XL è diminuito nella cute di pazienti psoriasici rispetto a quello osservato nella cute di un donatore sano. **L=Cute Lesionale; NL=Cute Non Lesionale; S= cute Sana.**

Allo scopo di valutare quantitativamente l'abbondanza delle due isoforme e la quantità relativa di ciascuna isoforma rispetto all'altra nel tessuto psoriasico è stata effettuata un'analisi densitometrica delle bande di BCL-XL dei *western blot* delle biopsie di cute psoriasica e cute sana utilizzando il programma ImageJ v1.29 (sviluppato da Wayne Rasband). Ciascuna misura densitometrica delle bande di BCL-XL è stata normalizzata per le bande dell'actina. La figura 36 rivela chiaramente che, la deamidazione di BCL-XL è diminuita sia nella cute affetta che nella cute non affetta dei pazienti psoriasici rispetto alla cute sana, dove le due isoforme di BCL-XL sono più o meno presenti in uguale misura.

Inoltre, è stato valutato il rapporto della densità relativa delle due isoforme, espresso come **percentuale di deamidazione**. **La deamidazione di BCL-XL risulta diminuita del 46% nella cute lesionale e del 25% nella cute non lesionale rispetto alla cute sana.** È, infatti, noto come anche la cute non lesionale del paziente psoriasico non sia completamente paragonabile alla cute sana di un soggetto non affetto. Questo risultato potrebbe essere attribuito al fatto che le tipiche alterazioni nell'architettura dell'epidermide e nel differenziamento dei cheratinociti, caratteristici delle lesioni psoriasiche, appaiono diverse da

quelle che si osservano nella cute non lesionale da un punto di vista istologico. Questo dato suffraga ancora di più l'ipotesi che, nelle lesioni psoriasiche possa esplicarsi un meccanismo molecolare, a noi ancora sconosciuto, che tra le varie alterazioni comporti l'inibizione della deamidazione della proteina BCL-XL e che, quindi possa determinare implicazioni patogenetiche associate al fenotipo psoriasico.



**Figura 36.** Profilo densitometrico delle bande ottenute dall'esperimento di western blot effettuato su estratti proteici di cheratinociti isolati da cute lesionale e non lesionale di pazienti psoriasici e controlli sani. Il livello di deamidazione della proteina BCL-XL è notevolmente inferiore nella cute psoriasica in confronto con la cute sana, in cui l'isoforma nativa e quella deamidata sono ugualmente espresse. Il rapporto della densità relativa delle due isoforme, espresso come percentuale di deamidazione, è del 46% nella cute lesionale e del 25% nella cute non lesionale da pazienti psoriasici, rispetto a cute da controlli sani.

## ANALISI E CARATTERIZZAZIONE DELLE DUE ISOFORME DI BCL-XL

Diversi lavori (Deverman *et al.*, 2003; Takehara *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2008) hanno riportato la comparsa di una forma deamidata di BCL-XL. In tali lavori si afferma che BCL-XL perde attività antiapoptotica in seguito alla deamidazione di due residui di asparagina (Asn52, Asn66), i quali sono pertanto convertiti in residui di acido isoaspartico (Deverman *et al.*, 2002). Takahara *et al.*, 2003 per confermare la deamidazione di BCL-XL in cellule HCCs (cellule di epatocarcinoma) ha analizzato la formazione di residui isoaspartilici nella proteina BCL-XL deamidata con buffer alcalino, attraverso un saggio radiochimico che utilizza l'attività metiltrasferasica della PCMT. La capacità metilaccettrice di BCL-XL che, correla con il contenuto in residui isoaspartilici, era aumentata significativamente dopo trattamento alcalino. Inoltre, mediante mutagenesi sito diretta ha dimostrato che la sostituzione di alanine in posizione 52 e 66 nella proteina BCL-XL impedisce la deamidazione e che, quindi, le asparagine in posizione 52 e 66 sono siti suscettibili alla deamidazione. Questi lavori hanno messo in evidenza che le due forme della proteina migrano separatamente su gel di poliacrilammide in SDS secondo un *pattern* in cui la banda superiore con massa molecolare di 32 kDa viene considerata l'isoforma deamidata, mentre la banda inferiore con massa molecolare di 30 kDa rappresenta la forma nativa. Tuttavia, questi lavori assumono che le due bande della proteina rappresentino la forma deamidata e quella nativa di BCL-XL attraverso degli approcci indiretti ma nessuno è riuscito a caratterizzare strutturalmente le due isoforme di BCL-XL. Per questo motivo, si è deciso di caratterizzare le due isoforme di BCL-XL attraverso un approccio più specifico e ad alta sensibilità: la *spettrometria di massa*.

La proteina BCL-XL è costituita da 233 aminoacidi ed è caratterizzata da un peso molecolare di 26KDa. Di questa proteina, a localizzazione citoplasmatica, sono state identificate due forme: una nativa ed una deamidata in cui due residui isoaspartilici sostituiscono le sequenze



Asn-Gly (52 e 66) all'interno di una regione particolarmente flessibile della proteina (figura 37).

```

1 MSQSNRELVV DFLSYKLSQK GYSWSQFSDV EENRTEAPEG TESEMETPSA INGNPSWHLA
61 DSPAVNGATA HSSSLDAREV IPMAAVKQAL REAGDEFELR YRRAFSDLTS QLHITPGTAY
121 QSFEQVVNEL FRDGVNWGRI VAFFSFGGAL CVESVDKEMQ VLVSRIAAMW ATYLNDHLEP
181 WIQENGWDT FVELYGNNAE AESRKGQERF NRWLTGMTV AGVVLLGSLF SRK

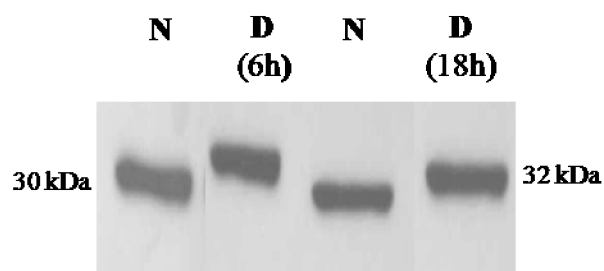
```

**THEORETICAL DEAMIDATION SITE**

**ACTUAL DEAMIDATION SITES**

Figura 37. Sequenza aminoacidica della proteina BCL-XL. In evidenza i siti bersaglio della deamidazione.

Le condizioni alcaline aumentano il rapporto di deamidazione in cui le asparagine sono convertite in una miscela di aspartati e isoaspartati. A tale scopo, abbiamo trattato uno standard della proteina BCL-XL con un tampone alcalino (Glicina/NaOH) che promuove in vitro la deamidazione delle asparagine, per 6 h e 18 h a 37°C, ed abbiamo esaminato la presenza delle due isoforme mediante *western blotting*. In figura 38 è mostrato il risultato del *western blotting* di uno standard di BCL-XL nativo e deamidato. È evidente come le condizioni alcaline promuovono la deamidazione proteica *in vitro* e sembrano modificare l'espressione di BCL-XL 30 kDa e produrre BCL-XL di 32 kDa. Questo risultato permette di concludere che **BCL-XL migra come una doppia banda relativamente alle presenza delle sue due isoforme e che la banda con massa molecolare di 32 KDa corrisponde all'isoforma deamidata mentre la banda di 30 KDa corrisponde all'isoforma nativa della proteina (fig. 38).**



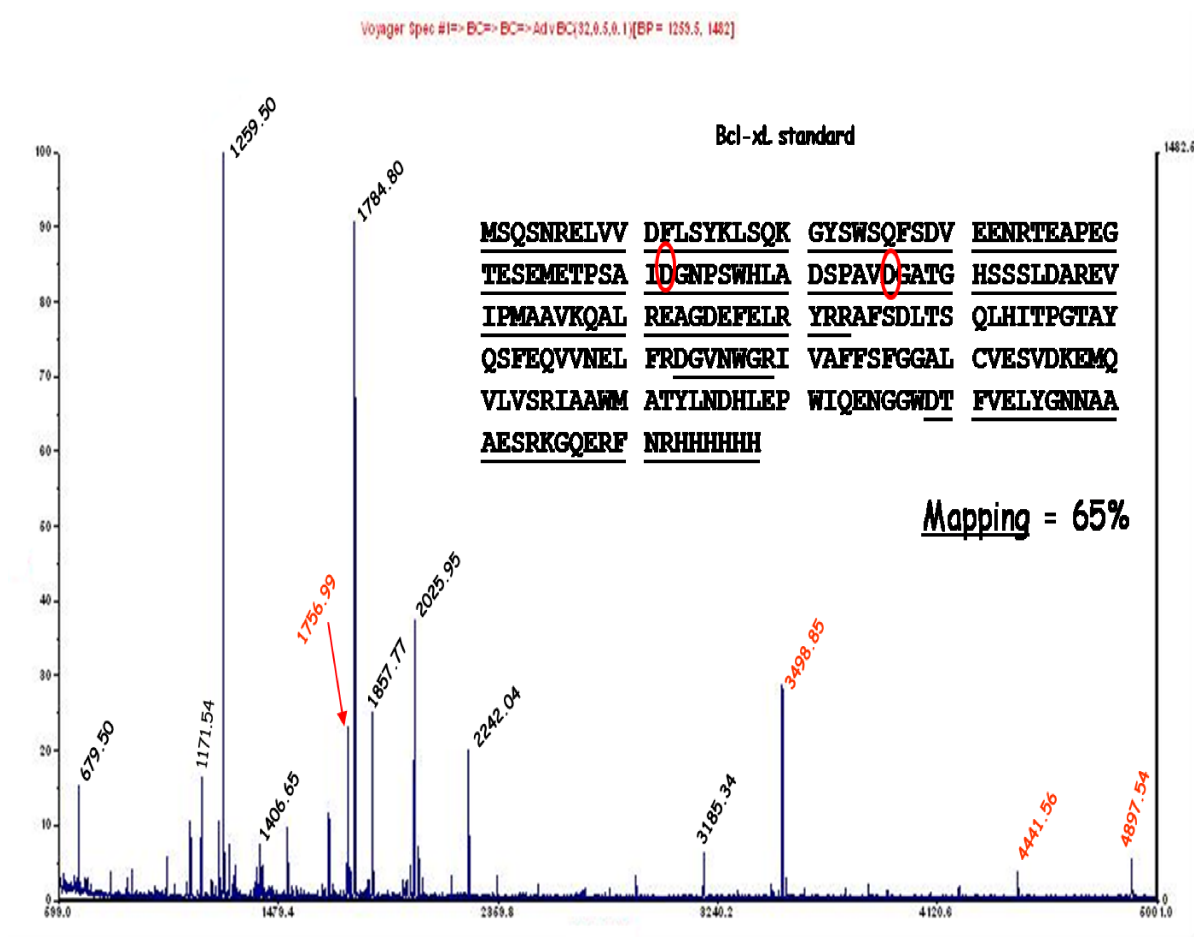
**Figura 38. Western blot con anticorpo diretto contro la proteina BCL-XL.** La banda relativa all'isoforma deamidata, sia dopo 6 ore che dopo 18 ore di trattamento, migra più lentamente di quella nativa, coerentemente con quanto osservato nella cute. Lo *shift* di migrazione è dovuto alla deamidazione che trasforma un residuo di Asn in un residuo di Asp o isoAsp. N= forma nativa di BCL-XL, D= forma deamidata di BCL-XL.

Dopo l'incubazione nel *buffer* di deamidazione il campione è stato idrolizzato, dapprima con tripsina, enzima che viene comunemente usato per questo tipo di analisi e che è in grado di idrolizzare i legami peptidici a livello delle estremità C-terminali degli aminoacidi lisina ed arginina. Successivamente, invece, è stato utilizzato l'enzima proteolitico *Asp/N* che taglia selettivamente a livello dei residui di acido aspartico. L'analisi della miscela peptidica ottenuta è stata realizzata mediante spettrometria di massa MALDI-TOF. Nella figura 39 è riportato lo spettro di massa ottenuto allo spettrometro MALDI-TOF analizzando i peptidi della proteina BCL-XL che sono caratterizzati da diversi valori di  $m/z$  a seconda della loro sequenza aminoacidica. Le analisi allo spettrometro MALDI-TOF producono quasi sempre ioni a singola carica, per cui i valori di  $m/z$  corrispondono al valore di massa molecolare del peptide più un idrogeno ( $m+1$ ). I segnali indicati con le frecce rosse corrispondono a quei peptidi contenenti le asparagine 52 e 66 e le cui masse molecolari corrispondono a quelle ottenute dalla digestione teorica della proteina BCL-XL con tripsina, e che sono riportate in banca dati (Tabella V) (Quando è presente una modifica post-traduzionale il peso molecolare

del peptide corrisponde al peso molecolare di quel peptide più il peso molecolare della specifica modificazione a cui è soggetto, nel nostro caso +1 Dalton).

**Concludendo le analisi MALDI-TOF della miscela di peptidi derivanti dalla digestione proteolitica della proteina BCL-XL ci hanno permesso di stabilire che effettivamente la proteina, sottoposta a deamidazione e digerita con tripsina e endoproteinasi AspN, presenta i residui 52 e 66 deamidati.**

Non si può però stabilire se a livello delle asparagine 52 e 66 nella forma deamidata sono presenti isoaspartati o aspartati. Per ottenere informazioni più precise su questi residui è quindi necessario sequenziare il peptide mediante analisi MS/MS.



**Figura 39. SPETTRO DELLA PROTEINA BCL-XL DEAMIDATA ANALIZZATA MEDIANTE SPETTROMETRIA MALDI-TOFF.** Lo spettro è stato ottenuto analizzando i peptidi della proteina BCL-XL che derivano dalla digestione con tripsina e Asp/N, riportando in ascisse i valori di  $m/z$  e in ordinate le abbondanze percentuali. I picchi evidenziati in rosso corrispondono ai peptidi contenenti i siti di deamidazione (Asn 52 e Asn 66). I peptidi contenenti le asparagine 52 (61-78) e 66 (29-60, 21-60, 17-60) subiscono deamidazione, in quanto, come si evince dalla tabella V il valore  $m/z$  teorico deamidato e quello sperimentale deamidato coincidono mentre la differenza tra il valore  $m/z$  non deamidato e deamidato è di +1 Dalton.

Campione	Asp	Peptidi	Valore Sperimentale Deamidato	Valore Teorico deamidato	ppm	Valore Teorico Standard (non Deamidato)
6 ore	66	61-78	1756.99	1756.80	108	1755.82
	52	29-60	3498.85	3498.52	94	3497.53
		21-60	4441.56	4440.91	146	4439.92
		17-60	4897.54	4897.20	71	4896.20
18 ore	66	61-78	1756.72	1756.80	45	1755.82
	52	29-60	3498.25	3498.52	77	3497.53
		21-60	4440.56	4440.91	78	4439.92

**Tabella V. “PEPTIDE MASS FINGERPRINT” di BCL-XL deamidata.** La tabella mette a confronto i valori di m/z, ottenuti dall’analisi di spettrometria di massa, coi valori m/z teorici attesi per gli stessi peptici, ottenuti in seguito alla doppia digestione enzimatica (tripsina e endoproteinasi AspN) della proteina BCL-XL nativa e deamidata e contenenti in posizione 52 e 66 rispettivamente Asn o isoAsp/Asp.

#### **IMMUNOPRECIPITAZIONE: CONFERMA DEI DATI OTTENUTI MEDIANTE WESTERN BLOT E SPETTROMETRIA DI MASSA.**

Per completare l’identificazione e verificare la coesistenza delle due isoforme di BCL-XL anche in una linea cellulare, l’esperimento di immunoprecipitazione è stato condotto su estratti proteici ottenuti da cellule HaCat.

L’immunoprecipitato è stato sottoposto a corsa elettroforetica sul gel di poliacrilammide e successiva ibridazione su filtro. Parallelamente, sullo stesso gel, sono stati caricati uno

standard di BCL-XL nativo, uno standard di BCL-XL sottoposto a deamidazione *in vitro* ed un estratto proteico totale ottenuto da cellule HaCat.

La Figura 40 evidenzia la differente mobilità elettroforetica delle due isoforme di BCL-XL. La banda elettroforeticamente più veloce (30 kDa) nell'immunoprecipitato corrisponde all'isoforma nativa di BCL-XL in quanto comigra con lo standard di BCL-XL nativo, mentre la banda lenta di 32 kDa nell'immunoprecipitato corrisponde all'isoforma deamidata di BCL-XL in quanto comigra con lo standard deamidato. Inoltre, caricando insieme standard nativo e deamidato di BCL-XL si forma una doppia banda che corrisponde esattamente alle bande di 30 e 32 kDa. **Questo risultato ci permette di confermare che la doppia banda osservata nell'immunoprecipitato e nell'estratto proteico totale di cellule HaCat corrisponde effettivamente alla forma nativa e alla forma deamidata di BCL-XL.**



**Figura 40.** Western Blot che mette in evidenza la differente mobilità elettroforetica delle due isoforme di BCL-XL e conferma la presenza di entrambe le isoforme in una linea cellulare di cheratinociti immortalizzati. .N= standard BCL-XL Nativo, D= standard BCL-XL Deamidato, N+D= Standard BCL-XL Nativo e Deamidato caricati insieme, HaCat= 20 ug di estratto proteico totale di cellule HaCat, IP= prtoteina BCL-XL immunoprecipitata dall'estratto proteico totale di cellule HaCat.

**Dalle osservazioni effettuate è possibile affermare, con sufficiente grado di confidenza, che le due bande osservate nella cute lesionale e non lesionale di pazienti affetti da psoriasi a placche rappresentano effettivamente la forma deamidata (proteina inattiva) e la forma nativa (proteina attiva) di BCL-XL, laddove l'isoforma deamidata risulta**

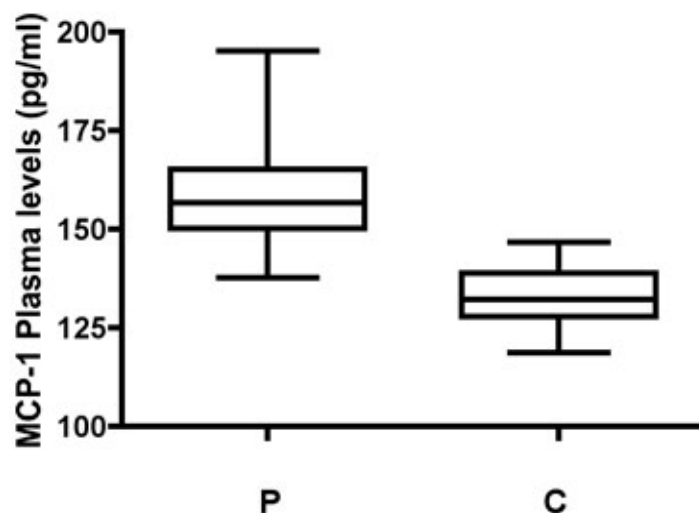
**essere diminuita nella cute psoriasica (il fenomeno è più accentuato nella cute lesionale) rispetto alla cute normale. Il decremento dei livelli dell'isoforma deamidata della proteina BCL-XL nella cute dei pazienti psoriasici potrebbe rappresentare un importante meccanismo attraverso il quale le cellule psoriasiche acquisiscono resistenza all'apoptosi e quindi, giocare un ruolo cruciale nell'insorgenza della placca psoriasica.**

### **DETERMINAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI DI MCP1**

La proteina MCP1, una proteina della famiglia delle chemochine-CC, è implicata nei processi infiammatori a carico dell'endotelio. Questa proteina, prodotta sia dall'endotelio che dai monociti, *in vitro* facilita l'adesione, mentre *in vivo* favorisce la migrazione dei monociti nel sub-endotelio e la successiva trasformazione in macrofagi. È riportato in letteratura che i livelli plasmatici della proteina MCP1 risultano elevati in soggetti psoriasici e tale dato è stato messo in relazione con la comparsa delle tipiche lesioni psoriasiche (Gillitzer *et al.*,1993, Deleuran *et al.*,1996). Uno degli agenti pro-infiammatori che determina la produzione di MCP1 da parte dell'endotelio è il TNF- $\alpha$ . I pazienti psoriasici resistenti a trattamenti convenzionali divengono eligibili ad entrare in terapia biologica con farmaci anti-TNF- $\alpha$  per bloccare o limitare i processi infiammatori a carico dell'endotelio esercitati da tale agente a livello delle lesioni. La risposta al trattamento è però estremamente variabile da soggetto a soggetto e non sono disponibili profili diagnostici e/o protocolli di valutazione che includano criteri clinici e/o strumentali consolidati in grado di predire la probabilità di risposta al trattamento biologico su base individuale. Pertanto l'efficacia di tali terapie può essere determinata solo a-posteriori, vale a dire seguendo un criterio *ex adjuvanti bus*, che, tra l'altro si rivela, entro certi limiti anche farmaco-specifica. Poiché tali trattamenti sono costosi e non scevri di effetti collaterali importanti, sarebbe auspicabile l'identificazione di marcatori

biologici capaci di predire, con sufficiente grado di confidenza, la risposta al trattamento in tempi brevi. Pertanto nel nostro studio siamo andati a verificare la possibilità di utilizzare i livelli plasmatici di MCP1 e dei suoi determinanti genetici, quali il polimorfismo -1258 A/G, come fattori di predizione precoci della risposta al trattamento biologico dei pazienti psoriasici. A tale scopo è stato selezionato un gruppo di pazienti psoriasici destinati alla terapia biologica e un gruppo di controlli adeguati. La determinazione dei livelli plasmatici di MCP1 è stata effettuata su prelievi di sangue effettuati al momento dell'arruolamento in terapia biologica (determinazione a tempo zero) e dopo 2 mesi dal trattamento. In tal modo è possibile monitorare gli effetti della terapia biologica sui livelli di MCP1 nel tempo.

I livelli plasmatici di MCP-1 nei pazienti affetti da psoriasi e nei controlli sono stati determinati mediante saggio Elisa. I risultati, riportati in figura 41 mostrano che **i livelli plasmatici di MCP-1 sono significativamente aumentati nei pazienti affetti da psoriasi a placche rispetto ai controlli.**



**Figura 41.** I livelli plasmatici di MCP1 in pazienti psoriasici sono più alti che nei controlli. Secondo l'analisi statistica (Mann Whithney test) le differenze tra i due gruppi sono altamente significative,  $p < 0.001$ . P= pazienti; C= controlli.



È interessante notare che la distribuzione di MCP-1 in entrambi i gruppi non è omoschedastica, quindi abbiamo utilizzato un test non parametrico per la valutazione dei livelli di MCP-1.

## **IL RUOLO DEL POLIMORFISMO -1258 A/G DI MCP1 SUI LIVELLI TRASCRIZIONALI DI MCP1.**

Il polimorfismo -1258 A/G nel gene che codifica la proteina MCP1, se in omozigosi, causa l'aumento dell'espressione di tale proteina e rappresenta una condizione predisponente ai fenomeni infiammatori (Rovin *et al.*, 1999). Questo polimorfismo è stato spesso associato a diverse malattie infiammatorie come l'asma bronchiale (Szalai *et al.*, 2001), il lupus nefrite (Tucci *et al.*, 2004) e la tubercolosi (Flores-Villanueva *et al.*, 2005). E' stato riscontrato una maggiore prevalenza di questo polimorfismo nella psoriasi della popolazione cinese, dove la frequenza dell'allele mutato sembra essere nettamente superiore rispetto alla popolazione Caucasica. Inoltre tale polimorfismo predisponenza ad un significativo aumento dei livelli plasmatici di MCP1 nei pazienti psoriasici cinesi. Questo lavoro (Wang *et al.*, 2007) rappresenta il primo studio sul polimorfismo di MCP1 nella psoriasi e suggerisce che soggetti con genotipo AG o GG mostrano alti livelli plasmatici di MCP1 e sono, pertanto, soggetti ad alto rischio di contrarre la psoriasi. Alcuni ricercatori hanno trovato, però, che il polimorfismo di MCP1 mostra genotipi diversi tra le varie etnie e che la frequenza dell'allele GG è maggiore nella popolazione asiatica e messicana rispetto a quella caucasica, africana ed americana (Rovin *et al.*, 1999). Partendo da questi studi abbiamo analizzato la presenza di questo polimorfismo nella nostra popolazione oggetto dello studio in modo da valutare la possibilità di utilizzare il polimorfismo genomico -1258 A/G di MCP1 come fattore di predizione precoce, non solo dell'efficacia del trattamento biologico ma anche dell'eventuale condizione di *non responder* che caratterizza una percentuale piccola ma significativa dei

pazienti in trattamento. Tutti i pazienti psoriasici arruolati per questo studio ed i relativi controlli sono stati genotipizzati per il polimorfismo -1258 A/G di MCP1 i cui risultati sono mostrati in tabella VI.

	<b>Allele A</b>	<b>Allele G</b>
<b>PAZIENTI</b>	<b>76,6%</b>	<b>23,4%</b>
<b>CONTROLLI</b>	<b>73,4%</b>	<b>26,6%</b>

**Tabella.VI.** Frequenza allelica dei diversi genotipi nei pazienti e nei controlli.

Come si evince dalla tabella, nella nostra popolazione psoriasica la frequenza allelica dell'allele polimorfico (G) non è diversa rispetto al gruppo di controllo, indicando che non vi è alcuna influenza di questo polimorfismo nella determinazione dei livelli plasmatici MCP1. Abbiamo anche valutato la distribuzione del polimorfismo -1258 A/G di MCP1 all'interno del gruppo di pazienti affetti da psoriasi, rispetto sia ai livelli plasmatici di MCP1 che al PASI (Tabella VII). Ancora una volta, nessuna correlazione è stata osservata. **Questi risultati suggeriscono che il polimorfismo -1258 A/G di MCP1 non svolge alcun ruolo significativo né sui livelli di MCP1 e né nel determinare un miglioramento clinico nei nostri pazienti.**

	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>
<b>PASI</b>	<b>16,8%</b>	<b>19,8%</b>	<b>21,3%</b>
<b>MCP1 (pg/mL)</b>	<b>157,5±12,6</b>	<b>156,6±11,37</b>	<b>176,9±25,8</b>

**Tabella VII.** Valori di PASI e concentrazione plasmatica di MCP1 correlati al polimorfismo -1258 A/G in pazienti psoriasici

## **EFFETTI DELLE TERAPIE BIOLOGICHE SUI LIVELLI PLASMATICI DI MCP1.**

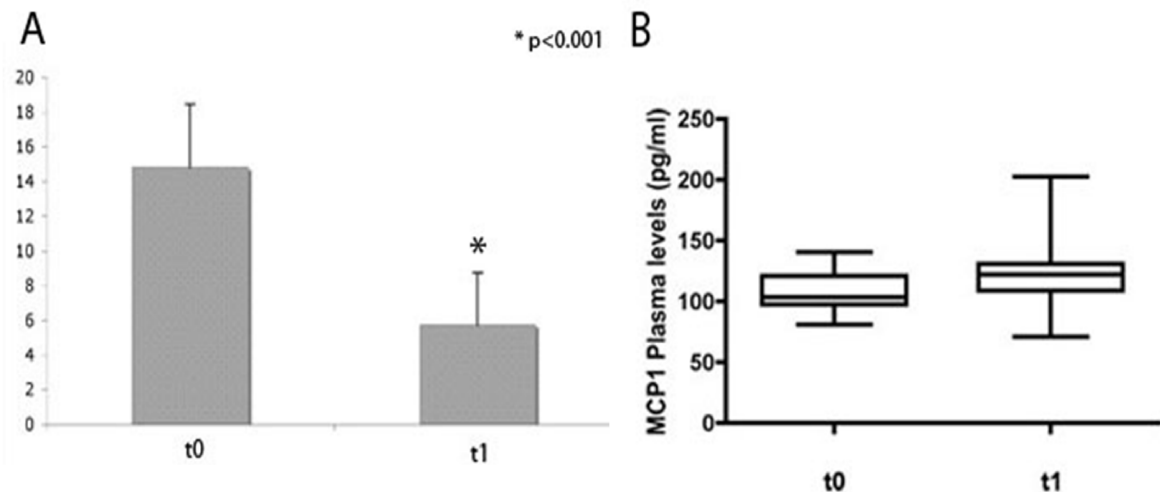
Al fine di indagare gli effetti delle terapie biologiche sui livelli di MCP1 nella psoriasi, del gruppo di pazienti iniziale ne abbiamo selezionato 18 soggetti a terapie biologiche. Questi sono stati poi divisi in due sottogruppi:

- A) Pazienti sottoposti a terapia biologica anti-CD11;
- B) Pazienti sottoposti a terapia biologica anti-TNF- $\alpha$ .

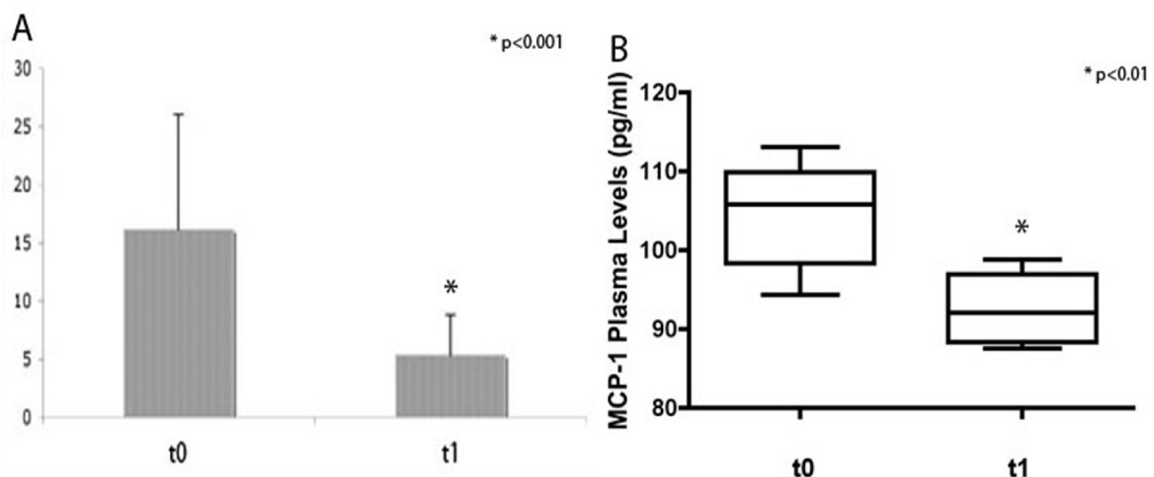
La valutazione del quadro clinico della psoriasi si è basata sul PASI. I campioni di sangue sono stati ottenuti prima e dopo due mesi di trattamento. I risultati relativi al gruppo A e B sono riportati in Fig. 42 e 43, rispettivamente. Tutti i pazienti hanno mostrato un miglioramento molto significativo dopo terapia biologica, in base alla diminuzione del PASI (confronta i pannelli A nella fig. 42 e 43). Al contrario, i livelli plasmatici di MCP1 sembrano essere notevolmente differenti nei due gruppi. In particolare, abbiamo trovato che la somministrazione di anti-CD11 non ha comportato alcuna alterazione significativa dei livelli plasmatici di MCP1. Tuttavia, si osserva una tendenza all'aumento dei livelli di MCP1 anche se non ha raggiunto la significatività statistica (Fig. 42, pannello B). Al contrario, i livelli di MCP1 sono stati effettivamente ridotti dopo somministrazione di anticorpi anti-TNF- $\alpha$  (Fig. 43, pannello B).

**Possiamo concludere che i livelli di MCP1 sono specificamente influenzati dalle singole terapie impiegate, in quanto solo l'anti-TNF- $\alpha$ , ma non l'anti-CD11, riduce efficacemente i livelli plasmatici di MCP-1. Ciò suggerisce che MCP1, in questi pazienti, non è un indicatore generico della risposta clinica alla terapia, in quanto l' anti-CD11 riduce il PASI, ma non i livelli di MCP-1. Potrebbe costituire, piuttosto, un marcatore specifico del monitoraggio degli effetti dei trattamenti anti-TNF- $\alpha$ , che a sua volta riduce sia PASI che i livelli di MCP-1. Gli effetti biologici dei due trattamenti sullo stato infiammatorio, anche a livello subclinico, sono notevolmente diversi, pertanto gli effetti**

osservati sui livelli plasmatici di MCP-1 potrebbero riflettere i diversi meccanismi di azione dei due trattamenti che consistono nell'inibire o bloccare gli effetti pleiotropici della cascata citochinica e l'adesione cellulare responsabile dell'infiammazione nella psoriasi nel caso degli anti-TNF- $\alpha$ , e nell' inibizione della citotossicità nel caso degli anti-CD11.



**Figura 42:** Effetto del trattamento anti-CD11 sul PASI e sui livelli plasmatici di MCP1. Pannello A: Effetto del trattamento sul PASI ( $p < 0.001$ ). Pannello B: Effetto del trattamento sui livelli plasmatici di MCP1 ( $p = \text{NS}$ )  $n = 9$ ; \* denota differenze statisticamente significative.



**Figura 43.** Effetto del trattamento con anti-TNF- $\alpha$  sul PASI e sui livelli plasmatici di MCP-1 Pannello A: Effetto del trattamento sul PASI ( $p < 0.001$ ). Pannello B: Effetto del trattamento sui livelli plasmatici di MCP-1 ( $p < 0.05$ )  $n = 9$ ; \* denota differenze statisticamente significative

## CONCLUSIONI

La psoriasi è una patologia infiammatoria cronica della cute ad eziologia sconosciuta, con una prevalenza del 2,8% nella popolazione italiana. Lo studio dei meccanismi patogenetici alla base dell'insorgenza della psoriasi è particolarmente complesso dal momento che questa patologia è tipica della specie umana e pertanto non esistono modelli animali adeguati (Gudjonsson JE. *et al.*, 2007). Nonostante tutti gli aspetti che caratterizzano l'eziopatogenesi della malattia psoriasica non siano ancora stati completamente chiariti, numerose evidenze sperimentali hanno confermato che alla base di tale patologia sussiste un sinergismo cooperativo tra i cheratinociti iperproliferanti e le cellule del sistema immunitario che mediano la risposta infiammatoria a livello delle lesioni che caratterizzano la cute interessata dalla patologia. L'infiammazione crea nella placca psoriasica una condizione di stress ossidativi che cronicizza insieme alla malattia. Come ampiamente riportato in letteratura, il globulo rosso rientra tra i sistemi cellulari più frequentemente esposti alle conseguenze di danni ossidativi; tali danni, che possono riguardare tutte le componenti cellulari, includono la rottura dei filamenti di DNA, la perossidazione lipidica, la riduzione della deformabilità e della fluidità di membrana e l'aumento patologico di reazioni di deamidazione delle proteine di membrana. Precedenti studi condotti dal nostro gruppo di ricerca, infatti, hanno dimostrato che, in seguito al trattamento degli eritrociti con agenti ossidanti esogeni, si assiste ad un incremento di siti deamidati a livello delle proteine di membrana. La deamidazione delle asparagine è una modificazione post-biosintetica spontanea ed è parte dei fisiologici processi di senescenza a cui le proteine vanno naturalmente incontro. I residui isoaspartilici, che possono determinare alterazioni strutturali più estese e comportare cambiamenti significativi nell'attività biologica delle proteine interessate, sono normalmente riparati attraverso una serie ciclica di reazioni, innescate dalla carbossimetilazione del residuo alterato. Tale reazione è catalizzata dalla proteina PIMT, la cui attività assume importanza critica per le proteine a

lunga vita media e per le cellule in cui la sintesi proteica è ridotta o assente. Varie ipotesi sono state avanzate per spiegare la ragione per cui il meccanismo di riparazione dei legami isopeptidici è di fondamentale utilità per la cellula (Reissner *et al.*, 2003). Una prima ipotesi sostiene che la reazione catalizzata dalla PIMT possa essere considerata un meccanismo di riparazione completo della proteina danneggiata, qualora i siti deamidati siano localizzati all'interno di una regione che non è critica per la funzione biologica della proteina. La seconda teoria propone che, pur essendo un processo di riparazione incompleto, la conversione Asn/isoAsp/Asp possa determinare l'acquisizione, da parte della proteina riparata, di significative e vantaggiose proprietà. La terza teoria interpreta, infine, il processo catalizzato dalla PIMT come un meccanismo che, assicurando la rimozione di residui anomali di isoAsp, garantisce un'efficiente degradazione, ad opera delle proteasi, delle proteine destinate alla rimozione, il cui riconoscimento potrebbe essere compromesso dalla presenza dei residui isoaspartilici. In condizioni in cui la produzione di residui isoaspartilici è superiore alla capacità di riparazione da parte della PIMT, o nelle situazioni in cui la reazione catalizzata da questo enzima è rallentata dalla presenza di inibitori, i legami isopeptidici anomali possono accumularsi e compromettere la funzione delle proteine che hanno subito tale danno molecolare. La PIMT utilizza come donatore di gruppi metilici l'AdoMet; l'attività della PIMT stessa è, di conseguenza, inevitabilmente influenzata dalla biodisponibilità di tale nucleoside solforato. L'AdoMet funge da donatore di gruppi metilici in più di 100 reazioni di metilazione, distinguibili per la loro capacità di trasferire il metile su atomi di ossigeno, azoto o zolfo, nell'ambito sia di piccole molecole che di macromolecole (Cheng *et al.*, 1999; Chiang *et al.*, 1996); la sintesi di sarcosina dalla glicina, la reazione di metilazione di gruppi nucleofili delle catene laterali aminoacidiche delle proteine e la metilazione delle citosine di molecole di DNA costituiscono solo alcuni esempi del vasto numero di reazioni in cui l'AdoMet funge da donatore del gruppo metilico. Nonostante tale vasta gamma di reazioni, la

metilesterificazione enzimatica delle proteine di membrana può essere considerata la principale reazione AdoMet-dipendente che avviene nell'eritrocita. È stato, infatti, dimostrato che l'AdoMet prodotta nel globulo rosso viene utilizzata per oltre il 90% nella reazione di riparazione dei residui danneggiati delle proteine (Freitag *et al.*, 1981). Il prodotto demetilato dell'AdoMet è l'AdoHcy, un potente inibitore competitivo delle metiltrasferasi che agisce attraverso un meccanismo a *feedback* negativo. È stato, infatti, dimostrato che in pazienti affetti da insufficienza renale cronica si ha una diminuzione dei livelli di metilesterificazione delle proteine della membrana eritrocitaria, dovuta ad un incremento significativo della concentrazione intracellulare di AdoHcy (Perna *et al.*, 1993). Risultati ottenuti dal nostro e da altri gruppi di ricerca hanno dimostrato che l'iperomocisteina, associata a condizioni patologiche acquisite o dovuta a cause nutrizionali e/o iatrogene, si riflette nella inibizione delle metiltrasferasi cellulari AdoMet-dipendenti, dovuta ad un incremento intracellulare di AdoHcy. In particolare, esistono evidenze in letteratura che descrivono, in pazienti affetti da psoriasi a placche, un aumento delle concentrazioni plasmatiche di Hcy, il cui livello ematico rappresenta un potente fattore predittivo di malattia cardiovascolare e disordini metabolici. Questa evidenza è in linea con la più spiccata predisposizione a obesità, diabete, infarto del miocardio e iperlipidemia, riportata in un recente lavoro (Rahat *et al.*, 2008). Allo scopo di verificare se l'aumento nella deamidazione che abbiamo osservato nelle proteine di membrana degli eritrociti di pazienti psoriasici è causato dalla condizione di stress ossidativo a cui queste cellule sono esposte, da un difetto nell'attività dell'enzima PIMT dovuto all'inibizione da parte dell'AdoHcy, o da entrambi, abbiamo dosato le concentrazioni intraeritrocitarie di AdoMet e AdoHcy tramite HPLC. Va sottolineato, a questo punto, che le concentrazioni intracellulari di entrambi i nucleosidi eccedono largamente i loro livelli plasmatici, in quanto gli enzimi MAT e AdoHcy idrolasi, nonché le metiltrasferasi, sono enzimi a localizzazione esclusivamente intracellulare. Pertanto, la valutazione delle concentrazioni intracellulari di

AdoMet e AdoHcy rappresenta un parametro molto più indicativo dell'efficienza dei processi di metilazione biologica di quanto non sia quella dei livelli plasmatici di tali composti. Più in particolare, il rapporto  $[AdoMet]/[AdoHcy]$ , definito *potenziale di transmetilazione*, è un indice delle capacità cellulare di trasferire gruppi metilici. Il potenziale di transmetilazione, calcolato a partire dalle concentrazioni intraeritrocitarie di AdoMet e AdoHcy di pazienti affetti da psoriasi, non è risultato significativamente differente da quello calcolato nei soggetti sani di controllo. **Questo risultato sembra suggerire il ruolo chiave svolto dai fenomeni di tipo ossidativo nella formazione di un eccesso di legami isopeptidici nelle proteine di membrana degli eritrociti di questi pazienti;** tale relazione causa-effetto merita dunque ulteriori approfondimenti, che saranno oggetto del prosieguo di questo lavoro di tesi. Il potenziale di transmetilazione, in quanto indice della capacità metiltrasferasica della cellula, influenza anche le reazioni di metilazione del DNA, dal momento che le DNMT sono tra le metiltrasferasi più sensibili all'inibizione esercitata dall'AdoHcy. D'altro canto, alterazioni dei meccanismi epigenetici contribuiscono ad un gran numero di patologie diverse, tra cui malattie a carattere oncologico o autoimmune (Millington, 2008). **Sebbene l'analisi dell'espressione di SYBL1 non suggerisca in pazienti psoriasici l'instaurarsi di una metilazione difettiva del DNA, non si può comunque escludere che nella psoriasi si instauri una condizione di ipometilazione genomica a carico di loci diversi.** Tale fenomeno è infatti descritto in letteratura per il gene SHP-1, che, represso nell'epidermide normale, si riattiva in cheratinociti derivati da lesioni psoriasiche in seguito alla ipometilazione del relativo promotore (Ruchusatsawat *et al.*). Meccanismi di tipo epigenetico possono dunque assumere un ruolo patogenetico rilevante nella psoriasi, così come già dimostrato per numerose malattie dermatologiche.



I cheratinociti e le cellule infiltranti del sistema immunitario svolgono un ruolo cooperativo nella formazione delle lesioni; tuttavia i meccanismi molecolari che regolano le complesse interazioni fra le due popolazioni cellulari non sono ancora completamente chiariti. La maggior parte delle ricerche scientifiche si è, finora, concentrata sulle diverse alterazioni del sistema immunitario durante la genesi della lesione psoriasica ed anche la ricerca nel campo dei farmaci antipsoriasici si è focalizzata sull'inibizione di numerose vie immunologiche. Al contrario, negli ultimi venti anni la componente cheratinocitaria è stata senza dubbio trascurata. Lo studio proteomico di cheratinociti primari isolati da cute sana e lesionale di pazienti psoriasici a confronto con la cute sana di un donatore sano ha rappresentato un potente strumento per l'analisi dei fattori alla base del fenotipo psoriasico. Le lesioni psoriasiche si presentano, a livello istologico, come zone di iperproliferazione, con un turnover epidermico accelerato di circa 10 volte rispetto alla pelle normale. In queste regioni i cheratinociti mostrano un difetto differenziativo che causa una maturazione incompleta e la mancata perdita dei nuclei nello strato corneo. Diverse linee di evidenza suggeriscono che 3 dei 9 loci genici di suscettibilità alla psoriasi fino ad oggi identificati siano coinvolti nel programma di differenziamento dei cheratinociti (Tschachler, 2007). Questo, assieme ad altre evidenze sperimentali, suggerisce come l'espressione di geni specifici del cheratinocita possa essere una componente importante nello sviluppo della malattia e giocare probabilmente un ruolo nella cronicizzazione e nelle frequenti ricadute della patologia. Meccanismi regolatori che controllano la proliferazione, il differenziamento, la risposta immunitaria e l'apoptosi delle cellule coinvolgono la modulazione di pathway di trasduzione in grado di trasmettere segnali dalla superficie della cellula a livello del DNA, risultando in cambiamenti nell'espressione genica e quindi del fenotipo.

Sembra che una maggiore quantità di proteine antiapoptotiche siano presenti nelle lesioni psoriasiche, in particolare BCL-XL. Infatti, la diminuzione dell'apoptosi nelle placche

psoriasiche è stata associata all'iperespressione di questa proteina. Tale proteina risulta iperespressa in seguito ad una up-regolazione della trascrizione del gene relativo, che si traduce in un aumento della proteina rispetto a quanto si osserva nella cute sana. Elevati livelli di espressione di BCL-XL sono stati trovati anche in alcuni tumori maligni umani come l'adenocarcinoma (Krajewska M. *et al.*, 1996) , il sarcoma di Kaposi ( Foreman K.E. *et al.*, 1996) e il mieloma multiplo (Tu Y. *et al.*, 1998). Pertanto, l'iperespressione di BCL-XL è considerata essere uno dei meccanismi attraverso cui cellule iperproliferanti acquisiscono resistenza all'apoptosi.

BCL-XL è una proteina particolarmente interessante; è un membro della famiglia di BCL2, comprende 233 aminoacidi e *in vivo* può trovarsi in due forme: quella **nativa** (iperespressa nei tessuti tumorali) che svolge funzione antiapoptotica, inibendo il rilascio del citocromo c dal mitocondrio, determinando la non attivazione della Caspasi 9 (caspasi iniziatrix) e permettendo l'inizio della cascata apoptotica, e quella **deamidata** che comporta la completa perdita di funzione della proteina, aumentando in tal modo la suscettibilità della cellula alla morte cellulare programmata. Da numerosi dati di letteratura appare chiaro che la proteina antiapoptotica BCL-XL (al pari di altre proteine implicate nel controllo dell'apoptosi) sia soggetta a deamidazione. Dati di letteratura dimostrano che BCL-XL perde attività antiapoptotica in seguito alla deamidazione di due residui di asparagina (Asn52, Asn66), i quali sono pertanto convertiti in residui di acido isoaspartico (Deverman *et al.*, 2002). Zhao *et al.* (Zhao e Oxley) hanno chiarito in maniera dettagliata che la deamidazione di BCL-XL è innescata specificamente da un meccanismo di iperespressione di una pompa protonica, scatenata da condizioni di stress cellulare indotto da UV, in grado di alcalinizzare il pH intracellulare, creando così un microambiente favorevole alla deamidazione (Zhao *et al.*, 2007).

I risultati discussi in questa tesi si inseriscono in tale contesto, delineando la possibilità di ipotizzare l'esistenza di un sistema che sembra correlare l'abbondanza relativa di alcune proteine che esplicano un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi cellulare regolata dall'apoptosi ed il fenotipo caratteristico delle lesioni psoriasiche. Tutte queste evidenze ci hanno suggerito la possibilità di valutare il ruolo della deamidazione nella regolazione dell'apoptosi che nelle malattie iperproliferative della pelle e, nella psoriasi, in particolare risulta sbilanciata.

Abbiamo osservato che nei pazienti psoriasici e, in misura maggiore nella placca, il livello di deamidazione di BCL-XL è diminuito. Tale diminuzione può essere attribuita:

- **Inibizione del meccanismo di demidazione.** La proteina BCL-XL nella cute di pazienti affetti da psoriasi a placche, per motivi che noi oggi non siamo in grado di spiegare, subisce una ridotta deamidazione. La diminuzione dell'abbondanza relativa della forma deamidata di BCL-XL rispetto alla sua forma nativa potrebbe essere dovuta ad una minore propensione della proteina a deamidare spontaneamente. Il rapporto BCL-XL nativa/BCL-XL deamidata potrebbe rappresentare un fine strumento di regolazione dell'equilibrio apoptosi/proliferazione nella placca psoriasica. Infatti, un minore livello di deamidazione e quindi, la predominanza della forma nativa di BCL-XL a livello della placca, potrebbe comportare un aumento delle molecole ad azione antiapoptotica. Questo meccanismo, sommato alla maggiore espressione costitutiva di BCL-XL nei tessuti psoriasici, potrebbe chiarire il ruolo di questa proteina nella modulazione del processo apoptotico in questa complessa patologia. In aggiunta, in biopsie di cute psoriasica è stato dimostrato un aumento nell'espressione di Fas, uno dei principali recettori di morte che attivano l'apoptosi per via estrinseca. Secondo un recente lavoro, l'iperespressione di Fas nel tessuto affetto è antagonizzata dagli elevati livelli di BCL-XL, che promuove la sopravvivenza. In

questa condizione il legame FAS/FASL non avrebbe l'effetto di scatenare la cascata apoptotica, ma piuttosto quello di attivare il TNF- $\alpha$  e l'IL-8 e innescare la risposta infiammatoria che si osserva in questa patologia.

- **Maggiore efficienza del meccanismo di riparazione dei legami isopeptidici, mediato dalla reazione di metilazione catalizzata dalla PIMT.** Questo enzima potrebbe essere in grado di ripristinare l'effetto protettivo di questa proteina nei confronti della morte cellulare programmata, come dimostrato in un recente lavoro del nostro gruppo (Cimmino *et al.*, 2008), dove la PCMT è in grado di riconoscere e riparare la proteina BCL-XL deamidata, spostando in questo modo l'equilibrio del sistema verso l'antiapoptosi. Regolando l'abbondanza relativa della forma nativa di BCL-XL rispetto alla sua forma deamidata, l'enzima PCMT potrebbe svolgere un ruolo importante nel mantenimento dell'equilibrio del processo apoptotico all'interno della cellula. All'interno di questo contesto la proteina enzimatica PCMT potrebbe rappresentare un potenziale bersaglio farmacologico nella cura della psoriasi e di altre patologie caratterizzate da iperproliferazione cellulare.

**Concludendo possiamo affermare che nelle placche psoriasiche la proteina BCL-XL è presente prevalentemente in forma nativa, ossia nella forma che compromette l'apoptosi. Questo dato, in aggiunta alla maggiore espressione costitutiva di BCL-XL nella psoriasi, potrebbe giocare un ruolo importante nella genesi della placca psoriasica. In altri termini, nel paziente psoriasico l'aumento di BCL-XL non è dovuto soltanto alla sua iperespressione, ma anche ad una ridotta deamidazione; tale fenomeno è particolarmente evidente nella cute lesionale.**

Nel corso degli anni, le nuove conoscenze acquisite sui meccanismi patogenetici della psoriasi sono aumentate. È ormai chiaro come il ruolo principale sia svolto dal sistema immunitario

del paziente che, in risposta a particolari stimoli ambientali, si attiva in maniera incongrua causando la comparsa della malattia. Pertanto, la maggior parte delle ricerche si è finora concentrata sulle diverse alterazioni del sistema immunitario durante la genesi della lesione psoriasica ed anche la ricerca nel campo dei farmaci antipsoriasici si è focalizzata sull'inibizione di numerose vie immunologiche. Tra tutte le cellule del sistema immunitario coinvolte nella patogenesi della psoriasi, è sempre stata focalizzata l'attenzione sul linfocita T e sulle citochine da esso prodotte e, non a caso, la psoriasi è stata considerata come il prototipo di malattia immunitaria linfocita Th1-mediata.

I linfociti T, una volta attivati, sono infatti in grado di migrare nella cute, di produrre una serie di citochine (IL-2, IFN $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e di innescare così, con la compartecipazione di cellule Natural Killer (NK), granulociti neutrofili, monociti-macrofagi, cheratinociti, cellule endoteliali e fibroblasti, quelle risposte infiammatorie responsabili della comparsa di malattia. Le possibilità terapeutiche topiche e/o sistemiche sono numerose ma la loro efficacia e tollerabilità sono talora limitate. Un quarto dei pazienti richiede terapie sistemiche il cui utilizzo è stato finora limitato. I pazienti affetti da forme severe di psoriasi possono usufruire di terapie sistemiche convenzionali che includono fototerapia UV, metotressate, acitretina o ciclosporina A. Le recenti acquisizioni sulla patogenesi della psoriasi hanno favorito lo sviluppo di terapie "biologiche". Possono accedere al trattamento "biologico", secondo le direttive del progetto *PSOCARE*, i pazienti che hanno controindicazioni, eventi avversi o sono non responders ad almeno due dei farmaci tradizionali. Allo stato attuale la mancanza di trials comparativi rende difficile individuare quale agente biologico sia da preferire e in rapporto al tipo di psoriasi o di paziente. Inoltre la risposta al trattamento è variabile ed attualmente l'unico criterio è di tipo "*ex adjuvantibus*" (Pincelli C, *et al.*, 2006).

Il principale bersaglio dell'immunoterapia con farmaci biologici nei pazienti psoriasici è il TNF- $\alpha$ . Il TNF- $\alpha$  è una citochina pleiotropica con diverse funzioni, tra cui quelle di mediare la

proliferazione cellulare, l'infiammazione e l'apoptosi. Nella cute psoriasica è espresso ad alti livelli in quanto liberato da numerose popolazioni cellulari, svolgendo un ruolo patogenetico cruciale. La proteina chemoattrattante 1 per i monociti (MCP1), risulta essere una delle principali chemochine protagoniste del reclutamento linfocitario e la sua concentrazione plasmatica è aumentata dal TNF- $\alpha$ . Il polimorfismo di un singolo nucleotide nella regione promotrice del gene di MCP1 (A1258G) è associato ad un'aumentata espressione della stessa chemochina; tale correlazione è stata riportata in diverse patologie infiammatorie. E' stato anche riportato un aumento di MCP1 nel plasma di pazienti affetti da psoriasi. L'obiettivo primario di questo studio è stato quello di verificare la possibilità di utilizzare i livelli plasmatici di MCP1 e dei suoi determinanti genetici (polimorfismo -1258 A/G) come fattori di predizione nella risposta al trattamento "biologico" dei pazienti psoriasici. Obiettivi secondari sono stati valutare l'efficacia delle diverse terapie biologiche attraverso il PASI, ossia il miglioramento clinico del paziente.

**I nostri dati evidenziano che la risposta clinica alla terapia con farmaci biologici non è in diretta correlazione con i livelli plasmatici di MCP1. Di conseguenza, i farmaci biologici, sebbene in grado di interferire con le vie di trasduzione del segnale innescate dal TNF- $\alpha$ , hanno un meccanismo di azione molecolare diverso da quello che induce l'aumento di MCP1. Inoltre, il polimorfismo di MCP1 non svolge alcun ruolo significativo nel determinare la condizione clinica o influenzare i livelli di MCP1 nei pazienti oggetto dello studio.**

## BIBLIOGRAFIA

- **Aritomi M, Kunishima N, Inohara N, Ishibashi Y, Ohta S, Morikawa K.** Crystal structure of rat Bcl-xL. Implications for the function of the Bcl-2 protein family. *J Biol Chem.* 1997 Oct 31;272(44):27886-92.
- **Austin LM, Ozawa M, Kikuchi T, Walters IB, Krueger JG.** The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol.* 1999 Nov;113(5):752-9.
- **Bachelez H.** Immunopathogenesis of psoriasis: recent insights on the role of adaptive and innate immunity. *J Autoimmun.* 2005;25 Suppl:69-73. Epub 2005 Nov 2.
- **Baiqiu W, Songbin F, Guiyin Z, Pu L.** Study of the relationship between psoriasis and the polymorphic site C677T of methylenetetrahydrofolate reductase. *Chin Med Sci J.* 2000 Jun;15(2):119-20
- **Baldwin AS.** Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest.* 2001 Feb;107(3):241-6
- **Barber JR, Clarke S.** Demethylation of protein carboxyl methyl esters: a nonenzymatic process in human erythrocytes? *Biochemistry.* 1985 Aug 27;24(18):4867-71.
- **Batinac T, Zamolo G, Hadzisejdić I, Zauhar G, Brumini G, Ruzić A, Persić V.** Expression of Bcl-2 family proteins in psoriasis *Croat Med J.* 2007 Jun;48(3):319-26
- **Borgiani P, Vallo L, D'Apice MR, Giardina E, Pucci S, Capon F, Nisticò S, Chimenti S, Pallone F, Novelli G.** Exclusion of CARD15/NOD2 as a candidate susceptibility gene to psoriasis in the Italian population. *Eur J Dermatol.* 2002 Nov-Dec;12(6):540-2.
- **Bowcock AM, Krueger JG.** Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol.* 2005 Sep;5(9):699-711. Review. Erratum in: *Nat Rev Immunol.* 2005 Oct;5(10):826.
- **Bowcock AM, Barker JN.** Genetics of psoriasis: the potential impact on new therapies. *J Am Acad Dermatol.* 2003 Aug;49(2 Suppl):S51-6.

- **Briganti S, Picardo M.** Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2003 Nov;17(6):663-9.
- **Budtz PE, Christoffersen BC, Johansen JS, Spies I, Willumsen NJ.** Tissue kinetics, ion transport, and recruitment of mitochondria-rich cells in the skin of the toad (*Bufo bufo*) in response to exposure to distilled water. *Cell Tissue Res.* 1995 Apr;280(1):65-75.
- **Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R.** Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1992 Jun;13(6):245-51.
- **Callewaere C, Banisadr G, Rostène W, Parsadaniantz SM.** Chemokines and chemokine receptors in the brain: implication in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol.* 2007 Mar;38(3):355-63.
- **Cantoni GL.** The role of S-adenosylhomocysteine in the biological utilization of S-adenosylmethionine. *Prog Clin Biol Res.* 1985;198:47-65
- **Capon F, Semprini S, Chimenti S, Fabrizi G, Zambruno G, Murgia S, Carcassi C, Fazio M, Mingarelli R, Dallapiccola B, Novelli G.** Fine mapping of the PSORS4 psoriasis susceptibility region on chromosome 1q21.. *J Invest Dermatol.* 2001 May;116(5):728-30.
- **Capon F, Munro M, Barker J, Trembath R.** Searching for the major histocompatibility complex psoriasis susceptibility gene. *J Invest Dermatol.* 2002 May;118(5):745-51.
- **Capon F, Dallapiccola B, Novelli G.** Advances in the search for psoriasis susceptibility genes. *Mol Genet Metab.* 2000 Sep-Oct;71(1-2):250-5.
- **Capon F, Semprini S, Dallapiccola B, Novelli G.** Evidence for interaction between psoriasis-susceptibility loci on chromosomes 6p21 and 1q21. *Am J Hum Genet.* 1999 Dec;65(6):1798-800.
- **Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP.** S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* 1996 Mar;10(4):471-80.
- **Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR.** Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science.* 2004 Feb 13;303(5660):1010-4.
- **Ciccodicola A, D'Esposito M, Esposito T, Gianfrancesco F, Migliaccio C, Miano MG, Matarazzo MR, Vacca M, Franzè A, Cuccurese M, Cocchia M, Curci A,**



- Terracciano A, Torino A, Cocchia S, Mercadante G, Pannone E, Archidiacono N, Rocchi M, Schlessinger D, D'Urso M.** Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xq/Yq pseudoautosomal region. *Hum Mol Genet.* 2000 Feb 12;9(3):395-401.
- **Cimmino A, Capasso R, Muller F, Sambri I, Masella L, Raimo M, De Bonis ML, D'Angelo S, Zappia V, Galletti P, Ingrosso D.** Protein isoaspartate methyltransferase prevents apoptosis induced by oxidative stress in endothelial cells: role of Bcl-XL deamidation and methylation. *PLoS One.* 2008 Sep 22;3(9):e3258.
  - **Clarke S.** Aging as war between chemical and biochemical processes: protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair. *Ageing Res Rev.* 2003 Jul;2(3):263-85.
  - **Clément MV, Stamenkovic I.** Superoxide anion is a natural inhibitor of FAS-mediated cell death. *EMBO J.* 1996 Jan 15;15(2):216-25.
  - **Cohen JJ.** Apoptosis. *Immunol Today.* 1993 Mar;14(3):126-30.
  - **Datta SR, Brunet A, Greenberg ME.** Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 1999 Nov 15;13(22):2905-27.
  - **Davies PF, Spaan JA, Krams R.** Shear stress biology of the endothelium. *Ann Biomed Eng.* 2005 Dec;33(12):1714-8.
  - **D'Angelo S, Ingrosso D, Perfetto B, Baroni A, Zappia M, Lobianco LL, Tufano MA, Galletti P.** UVA irradiation induces L-isoaspartyl formation in melanoma cell proteins. *Free Radic Biol Med.* 2001 Jul 1;31(1):1-9.
  - **D'Esposito M, Ciccodicola A, Gianfrancesco F, Esposito T, Flagiello L, Mazzarella R, Schlessinger D, D'Urso M.** A synaptobrevin-like gene in the Xq28 pseudoautosomal region undergoes X inactivation. *Nat Genet.* 1996 Jun;13(2):227-9.
  - **Deleuran M, Buhl L, Ellingsen T, Harada A, Larsen CG, Matsushima K, Deleuran B.** Localization of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1) in psoriasis. *J Dermatol Sci.* 1996 Dec;13(3):228-36.
  - **Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE.** Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009 Jun;29(6):313-26.
  - **Deverman BE, Cook BL, Manson SR, Niederhoff RA, Langer EM, Rosová I, Kulans LA, Fu X, Weinberg JS, Heinecke JW, Roth KA, Weintraub SJ.** Bcl-xL deamidation is a critical switch in the regulation of the response to DNA damage. *Cell.* 2002 Oct 4;111(1):51-62. Erratum in: *Cell.* 2003 Nov 14;115(4):503.

- **Dierkes J, Jeckel A, Ambrosch A, Westphal S, Luley C, Boeing H.** Factors explaining the difference of total homocysteine between men and women in the European Investigation Into Cancer and Nutrition Potsdam study. *Metabolism*. 2001 Jun;50(6):640-5.
- **Elmore S.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
- **El-Domyati M, Barakat M, Abdel-Razek R, El-Din Anbar T.** Apoptosis, P53 and Bcl-2 expression in response to topical calcipotriol therapy for psoriasis. *Int J Dermatol*. 2007 May;46(5):468-74.
- **Farout L, Friguet B.** Proteasome function in aging and oxidative stress: implications in protein maintenance failure. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Jan-Feb;8(1-2):205-16.
- **Flores-Villanueva PO, Ruiz-Morales JA, Song CH, Flores LM, Jo EK, Montaña M, Barnes PF, Selman M, Granados J.** A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *J Exp Med*. 2005 Dec 19;202(12):1649-58. Epub 2005 Dec 13.
- **Foreman KE, Wrone-Smith T, Boise LH, Thompson CB, Polverini PJ, Simonian PL, Nunez G, Nickoloff BJ.** Kaposi's sarcoma tumor cells preferentially express Bcl-xL. *Am J Pathol*. 1996 Sep;149(3):795-803.
- **Freitag C, Clarke S.** Reversible methylation of cytoskeletal and membrane proteins in intact human erythrocytes. *J Biol Chem*. 1981 Jun 25;256(12):6102-8.
- **Galletti P, Ingrosso D, Manna C, Clemente G, Zappia V.** Protein damage and methylation-mediated repair in the erythrocyte. *Biochem J*. 1995 Mar 1;306 ( Pt 2):313-25.
- **Ghoreschi K, Mrowietz U, Röcken M.** A molecule solves psoriasis? Systemic therapies for psoriasis inducing interleukin 4 and Th2 responses. *J Mol Med*. 2003 Aug;81(8):471-80. Epub 2003 Jul 18.
- **Gilhar A, Yaniv R, Assy B, Serafimovich S, Ullmann Y, Kalish RS.** Fas pulls the trigger on psoriasis. *Am J Pathol*. 2006 Jan;168(1):170-5.
- **Gillitzer R, Wolff K, Tong, Muller C, Yoshimura T, Hartmann AA, Stingl G, Berger R.** MCP-1 mRNA expression in basal keratinocytes of psoriatic lesions. *J Invest Dermatol*. 1993 Aug;101(2):127-31.

- **Gottlieb AB, Chamian F, Masud S, Cardinale I, Abello MV, Lowes MA, Chen F, Magliocco M, Krueger JG.** TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J Immunol.* 2005 Aug 15;175(4):2721-9.
- **Gottlieb AB, Chaudhari U, Mulcahy LD, Li S, Dooley LT, Baker DG.** Infliximab monotherapy provides rapid and sustained benefit for plaque-type psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 2003 Jun;48(6):829-35.
- **Grubauer G, Romani N, Kofler H, Stanzl U, Fritsch P, Hintner H.** Apoptotic keratin bodies as autoantigen causing the production of IgM-anti-keratin intermediate filament autoantibodies. *J Invest Dermatol.* 1986 Oct;87(4):466-71.
- **Gudjonsson JE, Johnston A, Dyson M, Valdimarsson H, Elder JT.** Mouse models of psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2007 Jun;127(6):1292-308. Epub 2007 Apr 12.
- **Guilhou JJ, Molès JP.** New hypotheses in the genetics of psoriasis and other 'complex' diseases. *Dermatology.* 2008;216(2):87-92. Epub 2008 Jan 23.
- **Henseleit U, Rosenbach T, Kolde G.** Induction of apoptosis in human HaCat keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 1996 Oct;288(11):676-83.
- **Horn E, Gordon K, Mease P.** The first World Psoriasis and Psoriatic Arthritis Conference. *J Invest Dermatol.* 2007 Jul;127(7):1566-7.
- **Inaba M, Gupta KC, Kuwabara M, Takahashi T, Benz EJ Jr, Maede Y.** Deamidation of human erythrocyte protein 4.1: possible role in aging. *Blood.* 1992 Jun 15;79(12):3355-61.
- **Ingrosso D, Cimmino A, Perna AF, Masella L, De Santo NG, De Bonis ML, Vacca M, D'Esposito M, D'Urso M, Galletti P, Zappia V.** Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia. *Lancet.* 2003 May 17; 361(9370):1693-9.
- **Ingrosso D, Fowler AV, Bleibaum J, Clarke S.** Sequence of the D-aspartyl/L-isoaspartyl protein methyltransferase from human erythrocytes. Common sequence motifs for protein, DNA, RNA, and small molecule S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *J Biol Chem.* 1989 Nov 25;264(33):20131-9.
- **Ingrosso D, Kagan RM, Clarke S.** Distinct C-terminal sequences of isozymes I and II of the human erythrocyte L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase.

Biochem Biophys Res Commun. 1991 Feb 28;175(1):351-8. Erratum in: Biochem Biophys Res Commun 1991 Apr 15;176(1):549.

- **Ingrosso D, D'Angelo S, Perna AF, Iolascon A, Miraglia del Giudice E, Perrotta S, Zappia V, Galletti P.** Increased membrane-protein methylation in hereditary spherocytosis. A marker of cytoskeletal disarray. Eur J Biochem. 1995 Mar 15;228(3):894-8.
- **Ingrosso D, D'angelo S, di Carlo E, Perna AF, Zappia V, Galletti P.** Increased methyl esterification of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress. Eur J Biochem. 2000 Jul;267(14):4397-405.
- **Johnson BA, Langmack EL, Aswad DW.** Partial repair of deamidation-damaged calmodulin by protein carboxyl methyltransferase. J Biol Chem. 1987 Sep 5;262(25):12283-7.
- **Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW.** Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. Cell. 2002 Jan 25;108(2):153-64.
- **Jost M, Class R, Kari C, Jensen PJ, Rodeck U.** A central role of Bcl-X(L) in the regulation of keratinocyte survival by autocrine EGFR ligands. J Invest Dermatol. 1999 Apr;112(4):443-9.
- **Kanda N, Shimizu T, Tada Y, Watanabe S.** IL-18 enhances IFN-gamma-induced production of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in human keratinocytes. Eur J Immunol. 2007 Feb;37(2):338-50.
- **Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV.** Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer. 1994 Apr 15;73(8):2013-26. Review. Erratum in: Cancer 1994 Jun 15;73(12):3108.
- **Krajewska M, Fenoglio-Preiser CM, Krajewski S, Song K, Macdonald JS, Stemmerman G, Reed JC.** Immunohistochemical analysis of Bcl-2 family proteins in adenocarcinomas of the stomach. Am J Pathol. 1996 Nov;149(5):1449-57.
- **Krüger-Krasagakis S, Galanopoulos VK, Giannikaki L, Stefanidou M, Tosca AD.** Programmed cell death of keratinocytes in infliximab-treated plaque-type psoriasis. Br J Dermatol. 2006 Mar;154(3):460-6.
- **Kuwano Y, Fujimoto M, Watanabe R, Ishiura N, Nakashima H, Ohno Y, Yano S, Yazawa N, Okochi H, Tamaki K.** Serum chemokine profiles in patients with alopecia areata. Br J Dermatol. 2007 Sep;157(3):466-73. Epub 2007 May 8.

- **Krueger JG.** The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol.* 2002 Jan;46(1):1-23; quiz 23-6.
- **Ishigame H, Nakajima A, Saijo S, Komiyama Y, Nambu A, Matsuki T, Nakae S, Horai R, Kakuta S, Iwakura Y.** The role of TNFalpha and IL-17 in the development of excess IL-1 signaling-induced inflammatory diseases in IL-1 receptor antagonist-deficient mice Ernst Schering Res Found Workshop. 2006;(56):129-53.
- **Ladino CA, O'Connor CM.** Methylation of atypical protein aspartyl residues during the stress response of HeLa cells. *J Cell Physiol.* 1992 Nov;153(2):297-304.
- **Lahn BT, Ma N, Breg WR, Stratton R, Surti U, Page DC.** Xq-Yq interchange resulting in supernormal X-linked gene expression in severely retarded males with 46,XYq- karyotype. *Nat Genet.* 1994 Nov;8(3):243-50.
- **Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ.** IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005 Jan 17;201(2):233-40.
- **Larrick JW, Wright SC.** Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor-alpha. *FASEB J.* 1990 Nov;4(14):3215-23.
- **Lathrop Stern L, Shane B, Bagley PJ, Nadeau M, Shih V, Selhub J.** Combined marginal folate and riboflavin status affect homocysteine methylation in cultured immortalized lymphocytes from persons homozygous for the MTHFR C677T mutation. *J Nutr.* 2003 Sep;133(9):2716-20.
- **Lebwohl M, Tying SK, Hamilton TK et al.** A novel targeted T-cell modulator, efalizumab, for plaque psoriasis. *N Engl J Med.* 2003; 349: 2004-13.
- **Lebwohl M.** Psoriasis. *Lancet.* 2003 Apr 5;361(9364):1197-204.
- **Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL, Pittman D, Wang F, Chamian F, Dhodapkar M, Krueger JG.** Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med.* 2004 Jan 5;199(1):125-30.
- **Lipozencić J, Batinac T, Peternel S, Pastar Z.** The role of CD4 and CD8 lymphocytes and macrophages in psoriasis vulgaris. Cabrijan L, *Acta Dermatovenerol Croat.* 2009;17(3):162-5.
- **Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ.** The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001 Feb 23;104(4):487-501.

- **Loehrer FM, Haefeli WE, Angst CP, Browne G, Frick G, Fowler B.** Effect of methionine loading on 5-methyltetrahydrofolate, S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in plasma of healthy humans. *Clin Sci (Lond)*. 1996 Jul;91(1):79-86.
- **Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG.** Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):866-73.
- **Lyon MF.** X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet Cell Genet*. 1998;80(1-4):133-7.
- **Malerba M, Gisondi P, Radaeli A, Sala R, Calzavara Pinton PG, Girolomoni G.** Plasma homocysteine and folate levels in patients with chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol*. 2006 Dec;155(6):1165-9. Erratum in: *Br J Dermatol*. 2007 Feb;156(2):410.
- **Marconi A, Vaschieri C, Zanolli S, Giannetti A, Pincelli C.** Nerve growth factor protects human keratinocytes from ultraviolet-B-induced apoptosis. *J Invest Dermatol*. 1999 Dec;113(6):920-7.
- **Martin K, Talukder R, Hay FC, Axford JS.** Characterization of changes in IgG associated oligosaccharide profiles in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis using fluorophore linked carbohydrate electrophoresis. *J Rheumatol*. 2001 Jul;28(7):1531-6.
- **McFadden PN, Clarke S.** Conversion of isoaspartyl peptides to normal peptides: implications for the cellular repair of damaged proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 May;84(9):2595-9.
- **Mizuguchi M, Sohma O, Takashima S, Ikeda K, Yamada M, Shiraiwa N, Ohta S.** Immunochemical and immunohistochemical localization of Bcl-x protein in the rat central nervous system. *Brain Res*. 1996 Mar 18;712(2):281-6.
- **Moll UM, Wolff S, Speidel D, Deppert W.** Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Dec;17(6):631-6. Epub 2005 Oct 13.
- **Nakashima H, Fujimoto M, Asashima N, Watanabe R, Kuwano Y, Yazawa N, Maruyama N, Okochi H, Kumanogoh A, Tamaki K.** Serum chemokine profile in patients with bullous pemphigoid. *Br J Dermatol*. 2007 Mar;156(3):454-9.
- **Naldi L, Gambini D.** The clinical spectrum of psoriasis. *Clin Dermatol*. 2007 Nov-Dec;25(6):510-8.
- **Pastore S, Mascia F, Mariotti F, Dattilo C, Girolomoni G.** Chemokine networks in inflammatory skin diseases. *Eur J Dermatol*. 2004 Jul-Aug;14(4):203-8.

- **Perna AF, Ingrosso D, Zappia V, Galletti P, Capasso G, De Santo NG.** Enzymatic methyl esterification of erythrocyte membrane proteins is impaired in chronic renal failure. Evidence for high levels of the natural inhibitor S-adenosylhomocysteine. *J Clin Invest.* 1993 Jun;91(6):2497-503.
- **Pincelli C, Bonté F.** The 'beauty' of skin neurobiology. *J Cosmet Dermatol.* 2003 Jul;2(3-4):195-8.
- **Pincelli C, Haake AR, Benassi L, Grassilli E, Magnoni C, Ottani D, Polakowska R, Franceschi C, Giannetti A.** Autocrine nerve growth factor protects human keratinocytes from apoptosis through its high affinity receptor (TRK): a role for BCL-2. *J Invest Dermatol.* 1997 Dec;109(6):757-64.
- **Płoski R, Luszczek W, Kuśnierczyk P, Nockowski P, Cisło M, Krajewski P, Malejczyk J.** A role for KIR gene variants other than KIR2DS1 in conferring susceptibility to psoriasis. *Hum Immunol.* 2006 Jul; 67(7):521-6.
- **Polakowska RR, Piacentini M, Bartlett R, Goldsmith LA, Haake AR.** Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm, and stem cells. *Dev Dyn.* 1994 Mar;199(3):176-88.
- **Potten CS, Loeffler M. Epidermal cell proliferation.** I. Changes with time in the proportion of isolated, paired and clustered labelled cells in sheets of murine epidermis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1987;53(5):279-85.
- **Pryor WA, Stanley JP, Blair E.** Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids.* 1976 May;11(5):370-9.
- **Punzi L, Podswiadek M, Sfriso P, Oliviero F, Fiocco U, Todesco S.** Pathogenetic and clinical rationale for TNF-blocking therapy in psoriatic arthritis. *Autoimmun Rev.* 2007 Sep;6(8):524-8. Epub 2007 Jan 8.
- **Radkiewicz JL, Zipse H, Clarke S, Houk KN.** Neighboring side chain effects on asparaginylyl and aspartyl degradation: an ab initio study of the relationship between peptide conformation and backbone NH acidity. *J Am Chem Soc.* 2001 Apr 18;123(15):3499-506.
- **Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD.** Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science.* 1993 Oct 29;262(5134):695-700.

- **Rahat O, Yitzhaky A, Schreiber G.** Cluster conservation as a novel tool for studying protein-protein interactions evolution. *Proteins*. 2008 May 1;71(2):621-30.
- **Reissner KJ, Aswad DW.** Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals? *Cell Mol Life Sci*. 2003 Jul;60(7):1281-95.
- **Rottman JB, Smith TL, Ganley KG et al.** Potential role of the chemokine receptors CXCR3, CCR4, and the integrin  $\alpha$ E $\beta$ 7 in the pathogenesis of psoriasis vulgaris. *LabInvest*. 2001; 81: 335-47.
- **Rovin BH, Lu L., Saxena R.** A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Jun 7;259(2):344-8.
- **Ruchusatsawat K, Wongpiyabovorn J, Shuangshoti S, Hirankarn N, Mutirangura A.** SHP-1 promoter 2 methylation in normal epithelial tissues and demethylation in psoriasis. *J Mol Med*. 2006 Feb;84(2):175-82. Epub 2005 Dec 31.
- **Russell TJ, Schultes LM, Kuban DJ.** Histocompatibility (HL-A) antigens associated with psoriasis. *N Engl J Med*. 1972 Oct 12;287(15):738-40.
- **Sabat R, Wallace E, Endesfelder S, Wolk K.** IL-19 and IL-20: two novel cytokines with importance in inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2007 May;11(5):601-12.
- **Sohma O, Mizuguchi M, Takashima S, Yamada M, Ikeda K, Ohta S.** High expression of Bcl-x protein in the developing human cerebellar cortex. *J Neurosci Res*. 1996 Jan 15;43(2):175-82.
- **Stoll SW, Benedict M, Mitra R, Hiniker A, Elder JT, Nuñez G.** EGF receptor signaling inhibits keratinocyte apoptosis: evidence for mediation by Bcl-XL. *Oncogene*. 1998 Mar;16(11):1493-9.
- **Storz P.** Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*. 2005 May 1;10:1881-96.
- **Stratis A, Pasparakis M, Rupec RA et al.** Pathogenic role skin macrophages in a mouse model of keratinocyte-induced psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest*. 2006; 116: 2094-104.



- **Szalai C, Kozma GT, Nagy A, Bojszkó A, Krikovszky D, Szabó T, Falus A.** Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Sep;108(3):375-81.
- **Szatrowski TP, Nathan CF.** Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 1991 Feb 1;51(3):794-8.
- **Takahashi H, Manabe A, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Iizuka H.** Aberrant expression of apoptosis-related molecules in psoriatic epidermis. *J Dermatol Sci.* 2002 Apr;28(3):187-97.
- **Takehara T, Takahashi H.** Suppression of Bcl-xL deamidation in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 2003 Jun 15;63(12):3054-7.
- **Tan JK, Aphale A, Malaviya R, Sun Y, Gottlieb AB.** Mechanisms of action of etanercept in psoriasis. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2007 May;12(1):38-45.
- **Traub M, Marshall K.** Psoriasis--pathophysiology, conventional, and alternative approaches to treatment. *Altern Med Rev.* 2007 Dec;12(4):319-30.
- **Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL, Jones AB, Camp RD, Frodsham A, Browne J, Barber R, Terwilliger J, Lathrop GM, Barker JN.** Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet.* 1997 May;6(5):813-20.
- **Tschachler E.** Psoriasis: the epidermal component. *Clin Dermatol.* 2007 Nov-Dec;25(6):589-95.
- **Tucci M, Barnes EV, Sobel ES, Croker BP, Segal MS, Reeves WH, Richards HB.** Strong association of a functional polymorphism in the monocyte chemoattractant protein 1 promoter gene with lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2004 Jun;50(6):1842-9.
- **Wang H, Peters T, Kess D et al.** Activated macrophages are essential in a murine model for T cell mediated chronic psoriasiform skin inflammation. *J Clin Invest.* 2006; 116: 2105-14
- **Vasku V, Bienertova-Vasku J, Necas M, Vasku A.** MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase) C677T polymorphism and psoriasis. *Clin Exp Med.* 2009 Dec;9(4):327-31.

- **Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick RN.** Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature*. 1996 Mar 7;380(6569):75-9.
- **Vestergaard C, Just H, Baumgartner Nielsen J, Thestrup-Pedersen K, Deleuran M.** Expression of CCR2 on monocytes and macrophages in chronically inflamed skin in atopic dermatitis and psoriasis. *Acta Derm Venereol*. 2004;84(5):353-8.
- **Vigneswara V, Lowenson JD, Powell CD, Thakur M, Bailey K, Clarke S, Ray DE, Carter WG.** Proteomic identification of novel substrates of a protein isoaspartyl methyltransferase repair enzyme. *J Biol Chem*. 2006 Oct 27;281(43):32619-29. Epub 2006 Aug 21.
- **Wang L, Yang L, Gao L, Gao TW, Li W, Liu YF.** A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with psoriasis. *Int J Immunogenet*. 2008 Feb;35(1):45-9. Epub 2007 Dec 18.
- **Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ.** Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem*. 2000 Sep 22;275(38):29318-23
- **Youle RJ, Strasser A.** The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Jan;9(1):47-59.
- **Young HA, Bream JH.** IFN-gamma: recent advances in understanding regulation of expression, biological functions, and clinical applications. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2007;316:97-117.
- **Zachariae H, Overgaard Petersen H, Kissmeyer Nielsen F, Lamm L.** HL-A antigens in pustular psoriasis. *Dermatologica*. 1977;154(2):73-7
- **Zhao R, Follows GA, Beer PA, Scott LM, Huntly BJ, Green AR, Alexander DR.** Inhibition of the Bcl-xL deamidation pathway in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2008 Dec 25;359(26):2778-89.
- **Zhao R, Oxley D, Smith TS, Follows GA, Green AR, Alexander DR.** DNA damage-induced Bcl-xL deamidation is mediated by NHE-1 antiport regulated intracellular pH. *PLoS Biol*. 2007 Jan;5(1):e1.
- **Zhu H, Yang W, Lu W, Zhang J, Shaw GM, Lammer EJ, Finnell RH.** A known functional polymorphism (Ile120Val) of the human PCMT1 gene and risk of spina bifida. *Mol Genet Metab*. 2006 Jan;87(1):66-70. Epub 2005 Oct 26.

